Untersuchungen über Enzyme des cAMP-Stoffwechsels
Versuche zur Isolierung von cAMP-bindenden Proteinen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOHANNA GRIMM
aus Dillingen/Donau

1974

74 134

Untersuchungen über Enzyme des cAMP-Stoffwechsels
Versuche zur Isolierung von cAMP-bindenden Proteinen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOHANNA GRIMM
aus Dillingen/Donau

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	21. Februar 1974
Dekan:	Prof.Dr.E.Bayer
1.Berichterstatter:	Prof.Dr.W.Frank
2.Berichterstatter:	Prof.Dr.G.Jung

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1971 bis Oktober 1973 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. Werner Frank am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, Tübingen (Direktor: Professor Dr. H.Friedrich-Freksa) ausgeführt. Herrn Dr. Frank danke ich für die vielseitige Unterstützung und grosszügige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit. Den Herrn U. Kirstein, H. Pachowsky, K. Rehn, H.-J. Ristow und J. Veser möchte ich für wertvolle Diskussionen und Ratschläge zur Ausführung von Experimenten danken. Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung meinen Dank für ihre Hilfsbereitschaft aussprechen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0039

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. Einleitung und Problemstellung 5

II. Material und Methoden 14

1. Zellkulturen 14

a) Anlegen der Zellkulturen 14

b) Kulturmedium 15

2. Gewinnung von Anti-cAMP-spezifischen Antikörpern 16

a) Synthese von 2'-O-Succinyl-cAMP 16

b) Darstellung von 2'-O-Succinyl-cAMP-Serumalbumin 18

c) Immunisierung von Kaninchen 19

d) Nachweis und Reinigung der Antikörper 19

3. Versuchsanordnung für die Messung des intra- und extrazellulären cAMP-Gehaltes embryonaler Rattenfibroblasten 22

4. Enzymteste 25

a) Phosphodiesterase EC 3.1.4.c 25

b) Adenylatcyclase 29

c) Adenosintriphosphatase EC 3.6.1.4 33

d) Succinatdehydrogenase EC 1.3.99.1 34

e) Lactatdehydrogenase EC 1.6.4.3 35

f) Glutamatdehydrogenase EC 1.4.1.2 36

g) Glucose-6-Phosphatdehydrogenase EC 1.1.1.49 36

5. Affinitätschromatographie 37

a) Darstellung von Aminopentylsepharose 4 B 37

b) Kupplung von Succinyl-cAMP an Aminopentylsepharose 4 B 38

c) Stabilität der Succinyl-cAMP-Aminopentylsepharose 4 B 39

d) Chromatographie an Succinyl-cAMP-Aminopentylsepharose 4 B 40

e) Charakterisierung des radioaktiven Eluats 41

6. Proteinkinasen 41

a) Isolierung von Proteinkinasen 41

b) Charakterisierung der Kinase 1 und 2 43

III. Ergebnisse 45

1. Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels nach Stimulierung der Zellen mit Serum ist nicht durch Abgabe des Nukleotids ins Kulturmedium bedingt 45

2. cAMP-spaltende Phosphodiesterase-Aktivitäten 47

a) Phosphodiesterase mit hoher Michaeliskonstanten (PDE II) 48

b) Phosphodiesterase mit niederer Michaeliskonstanten (PDE I) 50

c) Einfluss verschiedener Effektoren auf die PDE-I-Aktivität 53

d) Abhängigkeit der Phosphodiesterase-I-Aktivität vom Alter der Zellen 61

e) Kinetische Daten der Phosphodiesterase permanent wachsender Zellen 65

3. Adenylatcyclase-Aktivität 69

a) Einfluss von Calcium auf die Adenylatcyclase-Aktivität 71

b) Beeinflussung der Adenylatcyclase in vitro durch Serumfaktoren 75

c) Adenylatcyclase-Aktivität permanent wachsender Zellen 76

4. cAMP-bindende Proteine 78

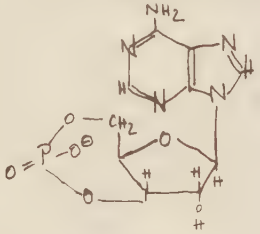
IV. Diskussion 84

Literaturverzeichnis 91

Abkürzungen 98

I. Einleitung und Problemstellung

Im Rahmen eingehender Untersuchungen zur Wirkungsweise von Hormonen entdeckte 1958 Earl W. Sutherland, Jr., das cyclische 3'5'-Adenosinmonophosphat (1).



Cyclisches AMP wird aus Adenosintriphosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat von dem Enzym Adenylatcyclase gebildet; der Abbau des Nukleotids erfolgt durch spezifische Phosphodiesterasen.

Die Adenylatcyclase wird durch eine Reihe von Hormonen stimuliert: Adrenalin, Glucagon, Vasopressin, ACTH u.a. Unter dem Einfluss dieser Regulationsstoffe entsteht cAMP, das verschiedene Wirkungen auslöst. Starling hatte um die Jahrhundertwende die Hormone als "chemische Boten" (chemical messengers) bezeichnet. Sutherland sprach dann von cAMP als dem "zweiten Boten" (second messenger), da cAMP ein wichtiges, vielleicht sogar universelles Zwischenglied in der Kausalkette der Hormonwirkungen ist.

Ein Boom an Publikationen über das cAMP setzte seither ein, wie Abb. 1 zeigt.

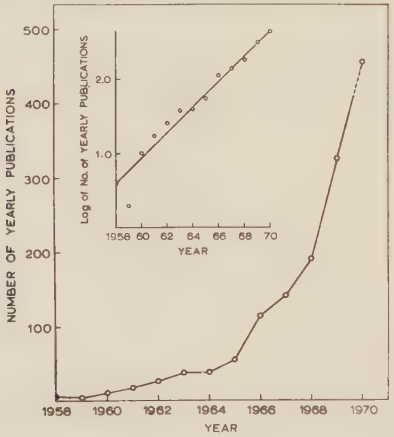


Abb.1 Zahl der Publikationen über cAMP, 70 verschiedene Zeitschriften waren Grundlage für diese Ermittlung. Annual Review of Biochemistry 40, 472 (1970)

In Eukaryonten wie in Prokaryonten greift das cAMP in die regulatorischen Prozesse der Zelle ein. Sowohl die Zellproliferation als auch die -differenzierung werden von cAMP beeinflusst. Mehrere Beispiele für die Wirkungen von cAMP sind in Tab. 1 aufgezeichnet.

	Gewebe	Effekt
Wirkungen auf Enzyme:		
Aktivität		
Fructose-1,6-diphosphatase	Niere	Steigerung
Glykogensynthetase	Muskel, Leber	Hemmung
Phosphorylase-Kinase	Muskel	Steigerung
Phosphorylase-Phosphatase	Adrenum	Hemmung
Proteinkinase	verschiedene	Steigerung
Induktion		
β-Galactosidase	*E. coli*	Steigerung
Glucose-6-phosphatase	Leber	Steigerung
PEP-Carboxykinase	Leber	Steigerung
Serindehydratase	Leber	Steigerung
Tyrosintransaminase	Leber	Steigerung
Physiologische Wirkungen		
Amylasesekretion	Parotis, Pankreas	Steigerung
Calcium-Resorption	Knochen	Steigerung
DNA-Synthese	Thymocyten	Steigerung
Fettsynthese	Leber	Hemmung
Gluconeogenese	Leber	Steigerung
Glykogenolyse	Leber	Steigerung
Harnstoffbildung	Leber	Steigerung
Hormonsekretion (ACTH, TSH, GH, Insulin u.a.)	verschiedene Drüsen	Steigerung
Ketonkörperbildung	Leber	Steigerung
Kontraktionsfähigkeit	Herzmuskel	Steigerung
Lipolyse	Fettgewebe	Steigerung
Permeabilität	Niere	Steigerung
Proteinsynthese	Leber	Hemmung
Salzsäureresektion	Magenschleimhaut	Steigerung
Zellaggregation	Schleimpilze	Steigerung
Zellaggregation	Thrombocyten	Hemmung

Tab. 1 Beispiele für das pleiotypisches Verhalten von cAMP. Naturwissenschaften 59, 212 (1972)

Pastan u. Perlman (2) zeigten bei E. coli, dass cAMP die Transkription des lac-Gens beschleunigt und dabei spezifisch die Initiierung der Transkription am "lac promotor" durch die RNA-Polymerase steuert. G. Zubay et al. (3,4) isolierten und reinigten das "catabolite-gene-activator protein (CAP)", das cAMP bindet. Es blieb bisher jedoch unklar, ob CAP eine Veränderung der lac-template Aktivität oder aber der RNA-Polymerase hervorruft.

Die Stimulierung der Synthese des Enzyms Tryptophanase in E. coli durch cAMP erfolgt auf der Translationsebene (5). Das cAMP scheint die Geschwindigkeit der Proteinsynthese an den Polysomen zu steigern;die Halbwertszeit der m-RNA für Tryptophanase (3 min) wird mit cAMP nicht verändert.

Auch bei Eukaryonten konnte der Einfluss des cAMP auf der Stufe der Transkription bzw. Translation gezeigt werden (6,7). Bei Ratten wird nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von Glucagon bzw. bu_2cAMP eine Reihe von Leberenzymen induziert; diese Neusynthese kann durch Protein- bzw. RNA-Syntheseblocker gehemmt werden. Durch Glucagon bzw. bu_2cAMP wird die Phosphorylierung des Histons F_1 um das 20-fache erhöht. Auch saure Kernproteine werden unter der Einwirkung von cAMP vermehrt phosphoryliert. Hypothese bleibt, ob durch Veränderung der Chromatinstruktur die Template-Aktivität modifiziert wird.

Daneben sind Enzymphosphorylierungen beschrieben, die durch cAMP beeinflusst werden: die Phosphorylase-b-Kinase, die Muskel-Glykogen-Synthetase, die Fettgewebslipase und die RNA-Polymerase. Greengard et al. (9) zeigten auch, dass die Phosphorylierung eines synaptischen Membranproteins durch cAMP gesteigert wird.

Besser untersucht ist die Wirkung des cAMP auf die Zellproliferation (10-18). 3'5'-Adenosinmonophosphat kann als Hemmer der Proliferation bezeichnet werden (19). Whitfield et al. konnten gleichzeitig die Bedeutung der extrazellulären Calciumkonzentration für die Proliferation von Lymphozyten und Hühnerfibroblasten zeigen (20, 21). Die Höhe des Ca^{2+}-Gehaltes ist bei der Proliferation transformierter Zellen nicht entscheidend (22). Zahlreiche Hormonwirkungen deuten auf eine Beziehung zwischen Ca^{2+} und cAMP hin. H. Rasmussen et al. (23) zeigten dies z.B. für das Insulin. Ein Ca^{2+}-ATP-Komplex soll danach die Schlüsselrolle zur Aufrechterhaltung der Membranstruktur u. -funktion einnehmen. Bei Umwandlung von ATP in cAMP wird aus dem starken Chelatbildner für Ca^{2+} ein schwacher; dabei wird Ca^{2+} entweder freigesetzt oder von Phospholipiden der Membran gebunden. Eine weitere Hypothese stellten Rubin et al. auf (24). ACTH soll durch Wechselwirkung mit seinem Membranrezeptor zur Abdissoziierung des Ca^{2+} von seiner Cyclase-Bindungsstelle führen. Folge davon ist eine Erhöhung der Adenylatcyclase-Aktivität.

Ausserdem werden zahlreiche Transportvorgänge an Membranen durch cAMP sowie durch Prostaglandin E_1, das die Adenylatcyclase stimuliert, verändert.

Bei Ovarialzellen von chinesischen Hamstern ist z.B. die Thymidin- und Uridin-Aufnahme um das 15-fache geringer nach Zusatz von bu_2cAMP ins Kulturmedium (25);

auch die Cytidinaufnahme ist gehemmt. G.M. Tomkins et al. zeigten diesen Effekt (26) ferner noch für Leucin und L-Deoxyglucose. Sie konnten dabei auch nachweisen, dass cGMP die normale Einbaurate von Leucin in Protein wieder herstellt.

Viele der bisher beschriebenen Versuche wurden an Zellen, die in Kultur gehalten werden, durchgeführt. Diese Zellen zeigen bei Zugabe von cAMP, bu_2cAMP, Theophyllin oder andere Reagentien, die den cAMP-Gehalt erhöhen, eine Reihe von physiologischen Phänomena.

1. Sie haften besser auf ihrer Unterlage (28), d.h., sie lösen sich weniger schnell ab (29).
2. Sie bewegen sich viel langsamer (30).
3. Sie sezernieren mehr saure Mucopolysaccharide ins Aussenmedium (31).
4. Transformierte Zellen zeigen bei Erhöhung des cAMP-Spiegels ähnliche Morphologie wie Normalzellen (32).
5. Transformierte Zellen lassen sich durch Pflanzenlektine stärker agglutinieren als Normalzellen. Diese vermehrte Agglutinierbarkeit lässt sich jedoch durch Erhöhung ihres intrazellulären cAMP-Gehaltes aufheben (33).
6. Die Zahl der tumorspezifischen Oberflächenantigene (TSSA) und der embryonalen Antigene (EA) von transformierten Zellen wird nach Zusatz von bu_2cAMP + Theophyllin ins Kulturmedium erhöht (34).

Die meisten normalen Säugerzellen, die in Kultur gehalten werden, wachsen nur, wenn Serum dem Nährmedium beigefügt wird (35, 36). Embryonale Rattenzellen, die im serumfreien Medium inkubiert werden, häufen sich in der G_1-Phase des Zellzyklus an (37). Gibt man zu diesen Kulturen Kälberserum, so beginnen die Zellen 10-15 h später mit der DNS-Synthese. Zwischen der Stimulierung durch Serum und Beginn der DNS-Synthese müssen eine Reihe von Ereignissen ablaufen, wobei die Wirkung des Serums auf einen relativ kurzen Zeitraum beschränkt ist; denn entfernt man es nach 3-6 h wieder, so gelangen die Zellen dennoch zur DNS-Synthese. Der erste messbare Effekt nach Stimulierung ist ein drastischer Membranpotentialabfall (38) von -50 mV auf -17 mV (Zellinneres negativ). Der Einbau von ^{32}P-Orthophosphat (39) und von ^{3}H-Inositol in die Membranlipide (40) sowie die K^+- Ca^{2+}-(41) und ^{3}H-Uridin(42)-Aufnahme steigen stark an. Der cAMP-Gehalt der Zellen fällt innerhalb der ersten 10 min schlagartig ab (18, 43) und bleibt für die nächsten 6 h ungefähr gleich (44).

Wie schon erwähnt, wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch die Bildungsgeschwindigkeit aus ATP und Abbaugeschwindigkeit zu 5'AMP bestimmt. Eine Abnahme der Gleichgewichtskonzentration kann durch Aktivierung der Phosphodiesterasen, Hemmung des Adenylatcyclase-Systems bzw. gleichzeitige Beeinflussung beider Enzymsysteme erfolgen; eine weitere Möglichkeit

wäre ein verstärktes Ausströmen aus der Zelle. Für die rasche Abnahme der intrazellulären Konzentration des cyclischen Nukleotids nach Stimulierung dürfte eine Erhöhung der Phosphodiesterase-Aktivität infolge Neusynthese von Enzymmolekülen nicht in Frage kommen.

Alle bei Säugetierzellen bisher bekannten Induktionssysteme haben eine Latenzzeit von mindestens 1-2 Stunden, ehe nach Stimulierung die Enzymaktivitäten ansteigen (45, 46). Andererseits ist auch eine Inaktivierung des Adenylatcyclase-Systems infolge Abbaues unwahrscheinlich. Die Tryptophan-Oxigenase, ein Enzym mit einer der höchsten Abbaugeschwindigkeit, hat immerhin noch eine Halblebenszeit von 2-2 1/2 Stunden (47, 48).

Die Aktivierung der Phosphodiesterase sowie die Inaktivierung des Adenylatcyclase-Systems müsste demnach durch Effektoren erfolgen, die nach Stimulierung in die Zellen gelangen. Eines der im Kulturmedium vorhandenen Ionen könnte infolge der erhöhten Aufnahme in die Zellen die Aktivitäten der cAMP-metabolisierenden Enzyme beeinflussen oder aber die Membraneigenschaften so verändern, dass cAMP aus den Zellen strömt.

In dieser Arbeit wurde deshalb die Wirkung von Calcium- und Kaliumionen auf die Phosphodiesterase und die Adenylatcyclase normaler und transformierter (49) Zellen untersucht. Ferner sollte ein theoretisch mögliches Her-

ausdiffundieren von cAMP aus den Zellen nach Stimulierung mit Serum entweder nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Weiterhin sollte festgestellt werden, ob neben den regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinasen noch lösliche Bindungsproteine für cAMP in den Rattenfibroblasten vorhanden sind. Derartige Proteine sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

II. Material und Methoden

1. Zellkulturen

a) Anlegen der Zellkulturen

17-20 Tage alte Rattenembryonen (Stamm Marshall) wurden steril dem Uterus entnommen, Rückenmuskulatur und Extremitäten abgetrennt, mit einer Schere zerkleinert, 30 min bei 37°C mit 100 ml PBS-Trypsin gerührt und anschliessend durch eine sterile Gaze filtriert (35). Die Zellen wurden niedertourig abzentrifugiert, in modifiziertem Eagle-Medium mit 10 % Kälberserum suspendiert, in Roux-Flaschen ausgesät und in einem CO_2-begasten Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C angezüchtet. Um die beiden vorwiegenden Zelltypen, Fibroblasten und Myoblasten zu trennen, wurde die Eigenschaft der Fibroblasten ausgenutzt, sich wesentlich schneller als die Myoblasten an der Glaswand anzuheften (50).

Für einen Teil der Experimente wurden die Zellen in den Roux-Flaschen abtrypsiniert (0,25 % Trypsin-Lösung in PBS) und in Plastikkulturschälchen der Fa. Gateway International (USA (Falcon-Schälchen 60/10 mm) in einer Dichte von $0{,}5 \times 10^6$ ausgesät.

Die permanente Rattenzellinie entstand 1967 durch Spontantransformation einer stationären Sekundärkultur embryonaler Rattenzellen.

Diese Zellen wurden in modifiziertem Eagle-Medium unter Zusatz von 5 % Kälberserum gezüchtet.

b) Kulturmedium

Es wurde nach Angaben von Dulbecco (51) und Marcus (52) angesetzt.

Zusammensetzung des modifizierten Eagle-Mediums (mg/ml):

NaCl	6400	L-Methionin	30
KCl	400	L-Phenylalanin	66
$CaCl_2 x2\ H_2O$	265	L-Threonin	95
$NaH_2PO_4 x H_2O$	125	L-Tryptophan	16
$MgSO_4 x7 H_2O$	200	L-Valin	94
$Fe(NO_3)_3 x9\ H_2O$	0,100	L-Alanin	18
NaHCO3	3700	L-Asparaginsäure	30
Phenolrot	5	L-Glutaminsäure	75
Glukose	4500	Glycin	100
Streptomycin	100	L-Prolin	25
Penicillin	150	L-Serin	21
Hypoxanthin	25	Biotin	0,100
L-Glutamin	580	Cholin	4
L-Cystin	48	Nicotinamid	4
L-Trypsin	72	Ca-Panthothenat	4
L-Arginin x HCl		Pyridoxal x HCl	4
L-Histidin x HCl x H_2O	42	Thiamin	4
		Riboflavin	0,4
L-Isoleucin	105	i-Inosit	7
L-Leucin	105	Folsäure	7
L-Lysin x HCl	146		

Alle Salze, Aminosäuren und Vitamine wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2. Gewinnung von Antikörpern gegen cAMP

a) Synthese von 2'-O-Succinyl-cAMP

0,76 mMol Morpholin-N-N'-dicyclohexylcarboxamidin wurden in 7,5 ml heissem, wasserfreiem Pyridin gelöst (53, 54). Pyridin wurde über KOH getrocknet und fraktioniert destilliert. Die Fraktion zwischen 114-116°C wurde weiter verwendet. Innerhalb von 30-60 min wurden 0,7 mMol wasserfreies cAMP (in der Trockenpistole bei 40°C über P_2O_5 getrocknet) hinzugefügt. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden 10 mMol getrocknetes Bernsteinsäureanhydrid zugegeben. Anschliessend wurde 18 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Das nicht umgesetzte Anhydrid wurde mit 3,75 ml Wasser bei 4°C hydrolysiert (ungefähr 2 h stehenlassen). Das Wasser-Pyridin-Gemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Um das restliche Pyridin zu beseitigen, wurde der Rückstand wiederholt in H_2O aufgenommen und bei 40°C vakuumdestilliert. Das Restsediment wurde dann in 2-3 ml H_2O aufgenommen und auf pH 4,5 gebracht. Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung auf Cellulose (Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser 12 : 3 : 5) zeigte cAMP einen Rf von 0,3; 2'-O-Succinyl-cAMP hatte einen Rf von 0,42. Präparativ wurde Succinyl-cAMP über eine Dowex 50(H^+-Form)-Säule

gereinigt. Elutionsmittel war destilliertes Wasser. Wie eine Rechromatographie zeigte, enthielt der zweite Adsorptionsgipfel das 2'-O-Succinyl-cAMP. Diese Fraktion wurde gepoolt und lyophylisiert. Der erste Gipfel, der in der Literatur nicht beschrieben ist, war durch einen rotbraunen Farbstoff bedingt. Zum Schluss wurde cAMP (chromatographische Identifikation)eluiert.

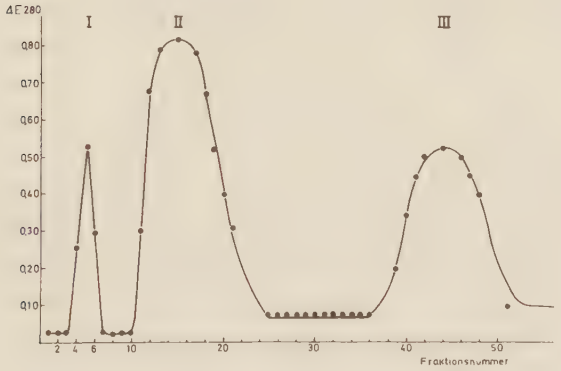


Abb. 2 Trennung von 2'-O-Succinyl-cAMP und cAMP durch Dowex 50(H^+)-Chromatographie. Nach einem nicht identifizierten Farbstoff wird 2'-O-Succinyl-cAMP und zuletzt cAMP eluiert.

Zur weiteren Reinigung wurde das 2'-O-Succinyl-cAMP in 2 ml Wasser, das 150 mg BaJ_2 enthielt, gelöst und das Ba-Salz des Nukleotids mit Äthanol-Äther (1:4)

ausgefällt. Nach zweistündigem Stehenlassen bei 4°C wurde das Präzipitat mehrere Male mit Äthanol-Äther (1:4) gewaschen.

b) Darstellung von 2'-O-Succinyl-cAMP-Serumalbumin

Zu 20 mg Serumalbumin, die in 2 ml Wasser gelöst sind, wurden nacheinander 10 mg 2'-O-Succinyl-cAMP sowie 1-Äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCl (EDC) hinzugefügt (55). Nach Zugabe jeder Substanz wurde der pH-Wert auf 5,5 eingestellt. Das

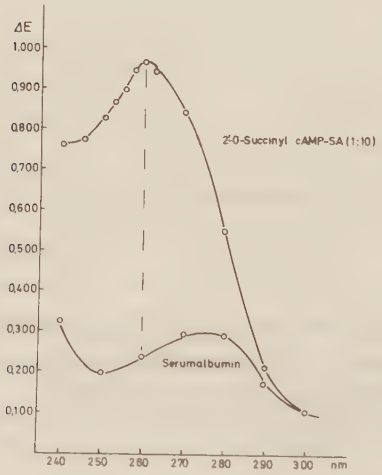


Abb. 3 Vergleich der beiden Spektren von 2'-O-Succinyl-cAMP-Serumalbumin und Serumalbumin

Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln stehengelassen. Danach wurde 48 Stunden bei $4^{o}C$ gegen PBS pH 7,4 unter häufigem Pufferwechsel dialysiert. Das Reaktionsprodukt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (Abb. 3). Unter Annahme eines molaren Extinktionskoeffizienten von 15 000 für 2'-O-Succinyl-cAMP errechnen sich pro Serumalbumin-Molekül ungefähr 3 cAMP-Reste:

eingesetzte Serumalbuminlösung	$0,145 \times 10^{-3}$M
Succinyl-cAMP-Lösung	$0,475 \times 10^{-3}$M.

c) Immunisierung von Kaninchen

Eine Lösung von 10 mg Serumalbumin-2'-O-Succinyl-cAMP in 0,5 ml PBS, pH 7,2, wurde in 0,5 ml complete Freund's Adjuvants emulgiert. Die homogene Emulsion wurde einem Kaninchen intramuskulär (M. subscapularis) injiziert. Nach 2 und 3 Wochen wurde das Tier mit je 5 mg Serumalbumin-Succinyl-cAMP geboostert. Vier Wochen nach Erstimmunisierung wurde das Kaninchen geblutet. Eine weitere Blutentnahme erfolgte erst, nachdem das Tier weitere 3 Boosterinjektionen erhalten hatte.

d) Nachweis und Reinigung der Antikörper

Das Blut wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und danach der Blutkuchen 1 Stunde in der Stock-Kühlzentrifuge bei Stufe 5 abzentrifugiert. Um nachzuweisen, ob eine Immunantwort vorhanden war, wurde mit dem

gewonnenen Serum eine Doppelgeldiffusion nach Ouchterlony sowie e ne Immunelektrophorese durchgeführt. Zur Geldiffusion wurden 10 ml 1,5% Agar und 0,5 % Phenol in PBS, pH 7,2, in eine Petrischale gegossen. Im mittleren Loch der Abb. 4 wurde das gewonnene Antiserum und in jeweils drei der sechs äusseren Löcher

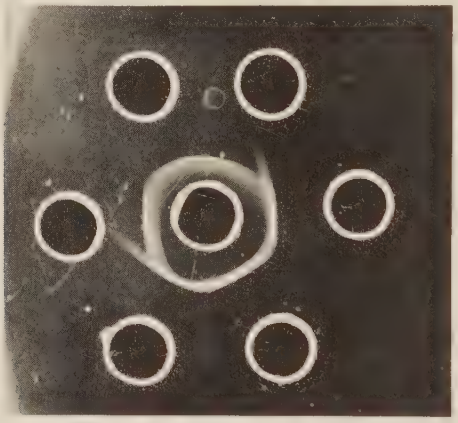


Abb. 4 Geldiffusion nach Ouchterlony. Im mittleren Loch wurde das Antiserum aufgetragen, in drei der äusseren Löcher Serumalbumin, in die restlichen drei 2'-O-Succinyl-cAMP-Serumalbumin.

Serumalbumin bzw. Serumalbumin-2'-O-Succinyl-cAMP aufgetragen. Die Präzipitationslinien zeigten einen Sporn bzw. Rabenschnabel, da dem Serumalbumin die Succinyl-cAMP-Determinante fehlte; dies bewies das Vorhandensein des Anti-cAMP-Antikörpers im Serum.

Ausser durch Doppeldiffusion wurde der Anti-cAMP-Antikörper immunelektrophoretisch nachgewiesen. Auf

einem mit Agar beschichteten Objektträger wurde in eines der 2 vorgestanzten Löcher Serumalbumin und in das andere Serumalbumin-2'-O-Succinyl-cAMP gegeben. Die Agarschicht bestand aus 4 ml 1,5 % Agar in 36 mM Veronalpuffer, pH 8,6. Die Elektrophoresezeit betrug 2 Stunden bei 5 mA/350 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde in der Mitte des Objektträgers eine Rille gestanzt und das Antiserum eingefüllt. Bei der nun stattfindenden Doppeldiffusion bildeten sich Präzipitationsbögen gegen beide Antigene aus. Das Kaninchenserum enthielt also Antikörper gegen cAMP.

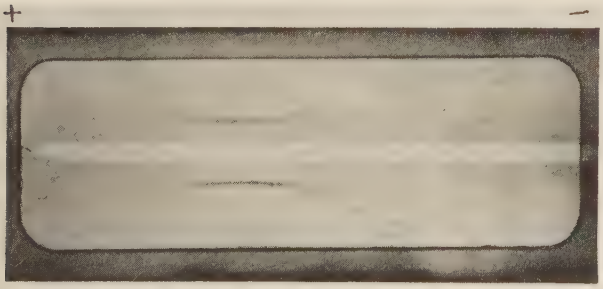
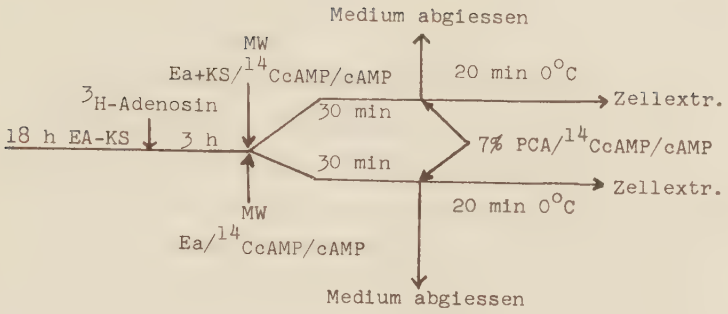


Abb. 5 Immunelektrophorese (0,036 M Veronalpuffer, pH 8,6, 2 Std/350 Volt). Präzipitationslinien des Antiserums mit Serumalbumin und 2'-O-Succinyl-cAMP-Serumalbumin.

Da das Serum Spuren von Phosphodiesterase-Aktivität zeigt (56), wurden die Globuline präzipitiert (57). Zu 100 ml Serum wurden 50 ml einer gesättigten Ammonsulfatlösung gegeben. Nach zweistündigem Stehen wurde bei 20 000 rpm 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 ml Wasser aufgenommen und wieder mit 25 ml einer gesättigten Ammonsulfatlösung präzipitiert. Nach einer Stunde wurde abzentrifugiert. Der zweite Präzipitationsschritt wurde vier- bis fünfmal wiederholt, bis der Überstand farblos war. Das endgültige Präzipitat wurde in 10 ml 0,05m Na-Acetatpuffer, pH 6,2, aufgenommen und gegen diesen Puffer ausgiebig bei 4°C dialysiert. Die Doppelgeldiffusion nach Ouchterlony zeigte, dass der Antikörper bei der Reinigung nicht verlorenging.

3. Versuchsanordnung für die Messung des intra- und extrazellulären cAMP-Gehaltes von embryonalen Rattenfibroblasten

Bei Bakterien (58) und einigen Säugetier-Zellinien in Kultur (59) kann cAMP durch die Zellwand hindurch ins Aussenmedium gelangen. Um die Frage zu klären, ob bei der Stimulierung embryonaler Rattenfibroblasten durch Kälberserum cAMP infolge von Membranveränderungen ins Kulturmedium abgegeben wird, wurde folgendes Versuchsschema gewählt:



Wie aus dem Schema ersichtlich ist, wurden die Rattenfibroblasten (in Falcon-Kulturschälchen, 60/10 mm) 18 Stunden im serumfreien Medium gehalten. Dann wurden in jedes Schälchen 5 µl ^{3}H-Adenosin (1 mCi/ml, spez. Aktivität 16,2 Ci/mMol; NEN) pipettiert und die Zellen weitere 3 Stunden inkubiert. Das Medium wurde anschliessend abgesaugt; die eine Hälfte der Kulturen erhielt je Schälchen 3 ml Eagle-Medium, das 0,1 mg /ml kaltes cAMP sowie 0,2 µl/ml 2-^{14}C-cAMP (0,1 mCi/ml; spez.Akt. 52,5 mCi/mMol; NEN) enthielt; die andere Hälfte wurde mit dem gleichen Medium inkubiert und zusätzlich mit 10 % Kälberserum stimuliert. In der angewandten Konzentration hatte das cAMP im Kulturmedium keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit durch Serum (10). Nach 10 bzw. 30 min wurden die Medien von den

Schälchen abgegossen und, wie unten beschrieben, aufgearbeitet.

Zu den Zellen wurde je Schälchen 3,0 ml eiskalte 7proz. Perchlorsäure-Lösung gegeben, die ebenfalls 0,1 mg /ml kaltes cAMP sowie 0,2 µl 2-^{14}C-cAMP enthielt. Die sauren Extrakte von jeweils drei Schälchen, die mit bzw. ohne Serum für 10 bzw. 30 min inkubiert worden waren, wurden vereinigt und mit KOH neutralisiert. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde abzentrifugiert, der Überstand im Vakuumexsikkator über P_2O_5 eingeengt und nach nochmaligem Zentrifugieren ($KClO_4$) auf PEI-Celluloseplatten (Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen; die PEI-Celluloseplatten waren zuvor mit bidestilliertem Wasser gewaschen worden. Die Chromatogramme wurden in einer feuchtigkeitsgesättigten Kammer mit 0,3 M wässriger LiCl-Lösung entwickelt, bis die Lösungsmittelfront den oberen Plattenrand erreicht hatte (43). DiecAMP-enthaltende Bande wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, von der Platte abgekratzt und das Nukleotid mit 1 ml siedender 7proz. Trichloressigsäure extrahiert. Die Radioaktivität in 0,5 ml des TCA-Extraktes wurde in 5,0 ml Dioxan-haltiger Zählerflüssigkeit (10 g PPO, 100 g Naphthalin, 1 ltr Dioxan) im Packard-Szintillationszähler, Modell 3375, ermittelt. Die Kanaleinstellung wurde so gewählt, dass weniger als 0,1 % der ^{3}H-Aktivität im ^{14}C-Kanal und 20 % der ^{14}C-Aktivität im ^{3}H-Kanal gemessen wurden; die Ergebnisse wurden entspre-

chend korrigiert.

Die Kulturmedien von je 3 Schälchen (mit und ohne Serum nachinkubiert) wurden ebenfalls vereinigt. Das cAMP wurde durch aufeinanderfolgende Adsorptionen an Dowex 2 x 8 (50-100 mesh; Serva) und Dowex 50 W x 2 (200-400 mesh; Serva) vorgereinigt (60). Das Dowex-50-Eluat wurde im Vakuum-Exsikkator über P_2O_5 eingeengt und der Rückstand auf PEI-Celluloseplatten weiter aufgetrennt, wie für die Perchlorsäureextrakte beschrieben wurde.

4. Enzymteste

Fibroblasten, die in Roux-Flaschen (30x10 cm) gezüchtet und während der ersten zwei Wochen jeden dritten Tag passagiert wurden, wobei je nach Zelldichte der Inhalt einer Flasche auf zwei bzw. drei Flaschen verteilt wurde, waren Ausgangsmaterial für die enzymatischen Experimente. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden bei den Versuchen Zellen zwischen der dritten und sechsten Passage verwendet.

a) Phosphodiesterase

Nach Abgiessen des Kulturmediums wurde der Zellrasen mit 30 ml Tris/Mg^{2+}-Puffer (10^{-2}M Tris/HCl, pH 8,0, 10^{-3}M Mg Cl_2) gespült. Dann wurden die Zellen mit 10 ml des Puffers abgeschabt, niedertourig in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, in 1,5 ml Tris/Mg^{2+}-Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in einem Homogenisator (Braun, Melsungen) bei 1500 U/min aufgebrochen. Das Homogenat wurde in der Kälte 18 Stdn gegen 600 ml Tris/Mg^{2+}-Puffer (zweimaliger Wechsel) dialysiert. Ein Aliquot wurde 30 min in 7proz. Trichloressigsäure im siedenden Wasserbad erhitzt; nach dem Zentrifugieren wurde im Überstand der DNA-Gehalt bestimmt (61) und mittels einer Eichkurve die Zellzahl ermittelt (62). Die Zellen für die Eichkurve waren mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschliessend ebenfalls in 7proz. TCA hydrolysiert worden.

Zur Bestimmung der Phosphodiesterase-Aktivität wurden bei 30°C vorinkubiert:

10 µl alkalische Phosphatase (Kälberdarm, Phosphodiesterase-frei, 350 E/ml; Fa. Boehringer Mannheim),

15 µl ^{3}H-cAMP (spez.Aktivität 463 mCi/mMol, NEN) in $2{,}9 \times 10^{-5}$M kalter cAMP-Lösung bei der Phosphodiesterase-Aktivität mit niedrigem K_{Mapp}, $2{,}9 \times 10^{-3}$M bei der Enzymaktivität mit hohem K_{Mapp},

15 µl Tris/Mg^{2+}-Puffer bzw. Ca^{2+}, K^+, cGMP (Fa.Boehringer Mannheim) oder bu_2cAMP (Fa. Boehringer Mannheim) in Tris/Mg^{2+}-Puffer.

Nach 15 min wurde der Ansatz in einem Eisbad abgekühlt und mit 400 µl der auf Phosphodiesterase-Aktivität zu testenden Lösung versetzt. 200 µl wurden sofort ent-

·nommen und ebenso behandelt, wie oben beschrieben. Die erhitzten Proben wurden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und im Überstand das cAMP bestimmt.

Zuerst erfolgte die Bestimmung des cAMP-Gehaltes im Überstand, wie bei II.3 beschrieben. Da bei kinetischen Messungen möglichst rasch gearbeitet werden muss, wurde ein "Schnellverfahren" für die Messung von cAMP entwickelt.

80 µl der Überstände wurden auf DEAE-Cellulose-Filterplättchen (Ø 2,5 cm; Fa. Schleicher & Schüll) aufpipettiert. Die Plättchen wurden für 7 min in eine 1 mM Ammoniumformiat-Lösung gelegt, danach zweimal mit 1 mM Ammoniumformiat gespült und für wenige Minuten mit 0,5 ml einer 7proz. TCA-Lösung behandelt. Anschliessend wurden 5 ml einer Dioxan-haltigen Zählerflüssigkeit zugegeben; die Lösungen wurden von den Plättchen abgegossen (um hohen und unterschiedlichen Quench zu vermeiden) und die ^{3}H- sowie ^{14}C-Aktivität im Packard-Tricarb-Szintillationszähler 3375 (s. II.3) bestimmt. Der Umsatz an cAMP ergab sich aus dem Quotienten der $^{3}H/^{14}C$-Verhältnisse von dem Wert nach 10 min Inkubationsdauer und dem Nullwert. Unter den angegebenen experimentellen Bedingungen war der Umsatz an cAMP für mindestens 20 min linear.

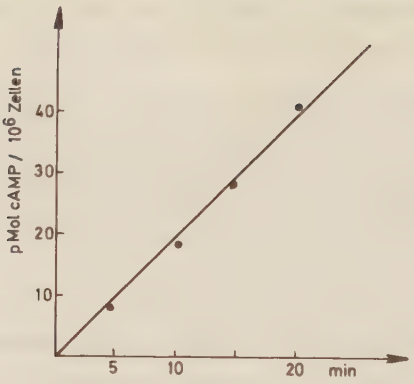


Abb. 6 Phosphodiesterase-Aktivität in Abhängigkeit der Zeit

Diese "DEAE-Filterplättchenmethode" lieferte bis zu 30 % Umsatz von cAMP gleiche Werte wie die PEI-Cellulose-Dünnschichtchromatographie, doch darüber hinaus wichen die Ergebnisse stark voneinander ab. Für die falschen Messdaten gab es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Da bei der DEAE-Adsorption und anschliessenden Extraktion mit TCA nur das Verhältnis der Radioaktivitäten gemessen wurde, könnte z.B. bei einer zu geringen alkalischen Phosphatase-Aktivität das 5'AMP, das bei der cAMP-Hydrolyse gebildet wird, nicht abgebaut werden und so ebenfalls an DEAE-Cellulose adsorbieren. Phosphodiesterase-Teste mit und ohne zusätzliche alkalische Phosphatase lieferten gleiche Ergeb-

nisse, d.h. im Zellextrakt ist eine genügend hohe Phosphatase-Aktivität, was schon früher gezeigt wurde (62). Wie bekannt ist, hat die Harnsäure, ein Abbauprodukt des Adenosins, einen relativ niederen pK-Wert (3,93) und kann deshalb an die DEAE-Cellulose adsorbiert werden . Bei konzentrierten Zellextrakten scheint die Xanthinoxidase also einen Einfluss auf das Testsystem zu haben. Daher wurde das Homogenat stets so weit verdünnt, dass der cAMP-Umsatz nie mehr als 30 % betrug.

Um cAMP mit Hilfe eines optischen Testes zu bestimmen, bei dem die Abnahme der molaren Extinktion (bei 265 nm) von Adenosin bei dessen Umwandlung in Inosin verfolgt wird (63); erwies sich die Enzymkonzentration als zu gering, selbst wenn das Zellhomogenat von 10 Flaschen (ca. 1,5 x 10^8 Zellen) verwendet wurde.

b) Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität

Fibroblasten in einem Kulturgefäss (ca. 20x10^6) wurden durch kurzzeitige Behandlung mit 0,5proz. Trypsin (Fa. Merck, Darmstadt) in PBS, pH 7,2, abgelöst, niedertourig abzentrifugiert, mit einer 0,025proz.Lösung von Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Fa. Serva, Heidelberg) und anschliessend zweimal mit Cyclase-Puffer (3,3mM $MgSO_4$, 40 mM Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM Theophyllin, 10 mM NaF) gewaschen. Dann wurden die Zellen in 2 ml des Puffers aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach Auftauen in einem

Potter-Homogenisator aufgebrochen. In einem Aliquot wurde der DNA-Gehalt gemessen und das Homogenat mit Cyclasepuffer so verdünnt, dass in einem ml das Äquivalent von 2 x 10^6 Zellen enthalten war. Sämtliche Enzymaktivitäten wurden auf die Zellzahl und nicht auf die Proteinmenge bezogen. Bei transformierten Zellen ist der DNA-Gehalt höher als bei Normalzellen; deshalb musste der aus der Eichkurve ermittelte Wert mit dem Faktor 0,72 multipliziert werden (64).

Zur Messung des membrangebundenen und freien Anteils der Cyclaseaktivität wurde das Homogenat 1 Stunde bei 130 000 x g zentrifugiert (Spinco-Ultrazentrifuge, Rotor SW 50) und das Sediment in Cyclasepuffer suspendiert. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml:

100 µl Creatinkinase (3,0 mg = 7,5 E/ml, Fa. Boehringer Mannheim),
100 µl Creatinphosphat (10^{-2}M, Fa. Boehringer Mannheim),
100 µl ATP (10^{-3}M, Fa. Boehringer Mannheim),
100 µl Puffer bzw. $Calcium^{2+}$, $Kalium^{1+}$-Lösung oder Serum,
600 µl Zellhomogenat.

Für den Nullwert wurden unmittelbar nach dem Zusammenpipettieren der Lösungen 400 µl entnommen und 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt (Nullwert). Der restliche Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert und dann

ebenfalls 400 µl 10 min erhitzt. Nach dem Zentrifugieren wurden von den Überständen je 100 µl zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes mit Hilfe des Antikörper-Bindungstestes (55) eingesetzt.

Mit einer Antikörper-Bindungs-Sättigungskurve wurde festgestellt, dass 100 µg Protein ausreichend sind; die Protein-Konzentration war nach Lowry (65) bestimmt worden. Zuvor war die optimale ^{3}H-cAMP-Konzentration ermittelt worden.

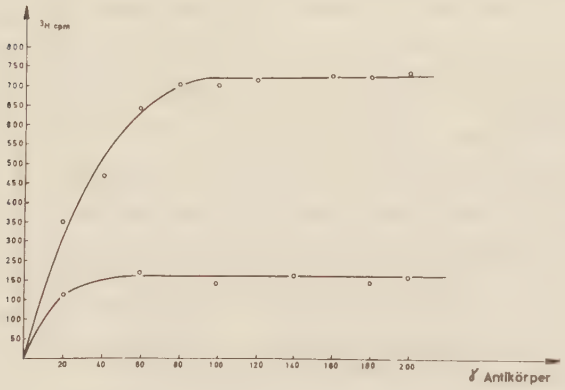


Abb. 7 cAMP-spezifische Antikörperbindungs-Sättigungskurve; Immunglobuline von nicht immunisierten Kaninchen als Kontrolle

Wie Abb. 7 zeigt, scheinen auch Globuline von nicht immunisierten Kaninchen eine geringe cAMP-Bindung zu besitzen.

Der Antikörperbindungsansatz enthielt:

200 µl Gammaglobulinlösung mit cAMP-spez.Antikörpern (0,5 mg/ml Na-Acetatpuffer, pH 6,2),

100 µl ^{3}H cAMP ($0{,}87 \times 10^{-12}$ Mol, spez.Aktivität 22,1 Ci /mMol; NEN),

100 µl 0,5 M Na-Acetatpuffer, pH 6,2,bzw. kaltes cAMP (zwischen 10^{-12} und 10^{-10}M) für die Eichkurve,

100 µl Überstand des erhitzten Inkubationsansatzes.

Nach 4 Stunden bei 0°C wurden 50 µl einer Lösung der Cohn II- und Cohn III-Fraktion (4 mg Protein/ml Acetatpuffer; Rinderserum, Fa. Calbiochem) sowie 2,5 ml einer 60proz. Ammoniumsulfatlösung zugegeben und die Niederschläge nach weiteren 15 Stunden bei 0°C auf Nitrocellulosefilter (0,45 µ Porenweite, Ø 2,5 cm, Fa. Sartorius, Göttingen) gesaugt. Die Filter wurden mit 60proz. Ammoniumsulfatlösung gewaschen; nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität in Toluol-haltiger Szintillatorflüssigkeit (4 g PPO/ l ltr Toluol) im Packard-Szintillationszähler 3375 gemessen.

Die Eichkurve wurde durch Zusatz von kaltem cAMP (Isotopen-Verdünnungsmethode) aufgenommen. Damit die Versuchsanordnung hierfür soweit wie möglich mit der für die Adenylatbestimmung identisch war, wurden zu jedem Ansatz 100 µl Zellextrakt, der dem Nullwert des Cyclasetestes entsprach, pipettiert.

Die Bildung von cAMP war unter den oben beschriebenen experimentellen Bedingungen über mindestens 20 min linear.

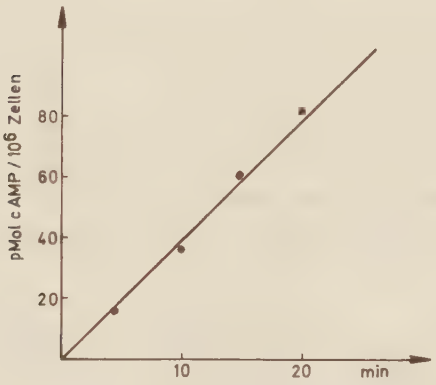


Abb. 8 Bildungsgeschwindigkeit von cAMP in Abhängigkeit der Zeit

c) Bestimmung der Adenosintriphosphatase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität der Homogenate (wie unter 4b beschrieben) wurde in Anlehnung an (66) bestimmt. Der Gesamtansatz enthielt:

100 µl 1 M Tris/Acetatpuffer, pH 7,8

50 µl 0,1 M $MgCl_2$

15 µl 0,01 M NADH (Fa. Boehringer, Mannheim)

20 µl LDH (5 mg/ml, 45 E/Ansatz; Fa. Boehringer, Mannheim)

20 µl 0,1 M ATP

20 µl 0,1 M Phosphoenol-Pyruvat (gelöst in 2 M KCl, Fa. Boehringer Mannheim)

700 µl Wasser

50 µl Zellhomogenat.

Die Reaktion:

$$PEP \xrightarrow[ADP \quad ATP]{PK} Pyruvat \xrightarrow[NAD]{NADH + LDH} Lactat$$

wurde durch die Abnahme der Extinktion bei 334 nm (Eppendorf-Photometer mit automatischem Registriergerät) verfolgt. Das Homogenat wurde jweils so weit verdünnt, dass die Reaktion mindestens 5 min linear verlief.

Der ATP-Gehalt wurde mit der Phosphoglycerat-Kinase /Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ermittelt (Testpackung Fa. Boehringer Mannheim).

d) Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

$$Succinat \xrightarrow{NAD} Fumarat + NADH_2$$

Der Succinat-Dehydrogenasetest wurde nach (67) modifiziert; die Enzymaktivität wurde aus dem Homogenat bestimmt, wie unter 4a beschrieben. Es wurden stets zwei Enzymkonzentrationen gewählt.

Der Inkubationsansatz enthielt:

2400 µl 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0

100 µl 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid = MTT, 1 mg/1 ml; Serva Heidelberg)

20 µl Phenazin-Methosulfat = PMS (1 mg/1 ml; Serva, Heidelberg)

180 µl Enzymextrakt.

Die Reaktion wurde mit 100 µl 1 M K-Succinatlösung, pH 7,0, gestartet. Das Phenazinmethosulfat (N-methylphenaziniummethosulfat) übeträgt Elektronen von NADH auf das MTT, um die NADH-Reaktion im sichtbaren Wellenlängenbereich messen zu können.

Der Reaktionsverlauf wird durch Zunahme der Absorption bei 546 nm (Eppendorf) verfolgt. Für die Berechnung der Enzymaktivität gilt:
Der Umsatz von 11,2 nMol NADH entspricht einer Veränderung von E_{546} um 0,10 (67).

e) Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität

Die Aktivität der LDH wurde aus dem gleichen Homogenat wie die SDH bestimmt.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH}_2 \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Es wurde die $NADH_2$-Absorptionsabnahme bei 334 nm (68) verfolgt. Der Inkubationsansatz setzte sich folgendermassen zusammen:

100 µl 0,5 M Triäthanolamin/0,05 M EDTA, pH 7,5

20 µl 10^{-2}M $NADH_2$ (Fa. Boehringer Mannheim)

90 µl H_2O

10 µl Zellhomogenat.

Mit 20 µl Pyruvat wurde die Reaktion gestartet. Die Umrechnung für die Enzymaktivität erfolgte nach der Absorptionsveränderung von $NAD(P)H_2$:

$$\Delta E_{334} = 6 = 1 \text{ µMol Umsatz.}$$

f) Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität wurde analog der SDH und LDH aus dem Zellhomogenat ermittelt (69). Hierzu diente wiederum der optische Test ($NADH_2$-Abnahme bei 334 nm).

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + NADH_2 + NH_4^+ \rightleftharpoons L(+)\ \text{Glutamat} + NAD + H_2O.$$

Der Inkubationsansatz bestand aus:

20 µl NADH/ADP-Lösung (8,2 mM $NADH_2$; 50 mM ADP in H_2O)
700 µl Triäthanolamin x HCl (70 mM, pH 8,0; 3,6 mM EDTA)
50 µl 2 M Ammoniumacetat-Lösung
200 µl Enzymextrakt.

Durch Zugabe von 30 µl α-Ketoglutarat-Lösung (6,9 mM) wurde die Reaktion gestartet.

g) Bestimmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP \overset{G\text{-}6\text{-}P\text{-}DH}{\rightleftharpoons} \text{Gluconsäure-6-P} + NADPH_2.$$

Die Bildungsgeschwindigkeit von $NADPH_2$ ist ein Mass für die Enzymaktivität. Diese wurde aus demselben Homogenat

wie 4d-f bestimmt. Der Enzymtestansatz wurde nach (70) abgewandelt und enthielt:

100 µl 0,5 M Triäthanolamin, pH 7,5; 0,05 M EDTA
50 µl 10^{-2}M NADP (Fa. Boehringer Mannheim)
700 µl H_2O
100 µl Enzymextrakt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 2 x 10^{-2}M Glucose-6-P (Fa. Boehringer Mannheim) gestartet. Die Zunahme der Absorption erfolgte erst nach 5 min Inkubationsdauer.

Die $K_{M\ app}$-und V_{max}-Werte wurden in einem Hewlett-Packard-Tischrechner, Modell 9020, nach einem Programm berechnet, das von Herrn Dipl.Biochem. H.R. Karfunkel in Anlehnung an (71) entwickelt wurde.

5. Affinitätschromatographie

Bindende Proteine für cAMP wurden aus dem Zytoplasma der Fibroblasten durch Affinitätschromatographie an Sepharose-4B-aminopentyl-succinyl-cAMP isoliert.

a) Darstellung der Aminopentylsepharose

Sepharose 4B (Pharmacia) wurde ausgiebig mit Wasser gewaschen, in gleichem Volumen Wasser aufgeschlämmt und mit 300 mg Bromcyan pro ml Sepharose unter kräftigem Rühren versetzt (Abzug!). Die Suspension musste

stets mit konzentrierter NaOH (5N) auf pH 11 titriert werden; die Temperatur sollte dabei 20°C nicht überschreiten. Die Bromcyanierung war beendet, sobald der pH-Wert nicht mehr absank. Dann wurde eine grössere Menge Eis dazugegeben und möglichst rasch in einem Büchnertrichter abgesaugt. Mit eiskaltem 0,05M $NaHCO_3$-Puffer, pH 8,5, wurde nachgewaschen. Anschliessend wurde schnell eine ebenso grosse Menge wie Sepharose an Diaminlösung (1 Mol/ml; pH 10) hinzugefügt und dann 16-20 Stunden bei 4°C gerührt. Die substituierte Sepharose wurde mit sehr grossen Volumina Wasser und Carbonatpuffer, pH 8,5, gewaschen. Um sicher zu sein, dass die Kupplung stattgefunden hat, wurde der Farbtest mit Natrium-2,4,6-Trinitrobenzolsulfonat durchgeführt (72). 1 ml gesättigte Natriumboratlösung wurde zu 0,5 ml der substituierten Sepharose gegeben und wenige Tropfen 3%iger wässriger Na-2,4,6-Trinitrobenzolsulfonatlösung hinzugefügt. Innerhalb einer Stunde trat eine intensive Orangefärbung ein, während nicht substituierte Sepharose 4B hellgelb blieb.

b) Kupplung von Succinyl-cAMP an Aminopentylsepharose

Diese Reaktion wurde in Analogie zur Darstellung von Östradiol-Sepharose (72) durchgeführt:

345 mg Succinyl-cAMP (0,75 mMol) wurden in 40 ml Dimethylformamid gelöst und zu 40 ml Aminopentylsepharose 4B gegeben. Der pH-Wert der Suspension wurde mit

1 N HCl auf 4,7 eingestellt, und schliesslich wurden noch 500 mg (2,6 mMol) 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid in 3 ml Wasser innerhalb 5 min dazugetropft. Die Kupplungsreaktion fand während der nächsten 20 Stunden bei Zimmertemperatur statt. Die substituierte Sepharose wurde mit einem sehr grossen Überschuss an 50%iger wässriger Dimethylformamidlösung gewaschen und dann mit PBS-Mercaptoäthanol, pH 7,2, äquilibriert.

c) Stabilität der Succinyl-cAMP-aminopentylsepharose

Da in der Literatur (73) ein cAMP-Sepharose-Kupplungsprodukt beschrieben war, das nicht stabil sein sollte, wurde analog 5a und 5b eine Kupplung durchgeführt, die 2'-O-Succinyl-^{3}H-cAMP als Reagens enthielt. Diese ^{3}H-substituierte Sepharose wurde mit PBS-Mercaptoäthanol, pH 7,2, 10^{-3}M Natriumazid äquilibriert, dann mit gleichem Volumen an Puffer versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Nach jeweils einigen Tagen wurde das Polymer abzentrifugiert (Stock-Zentrifuge), 1 ml des Überstandes sowie des Sediments mit je 1 ml 7proz. TCA im siedenden Wasserbad 15 min erhitzt und dann ein Aliquot mit Dioxan-haltiger Zählerflüssigkeit versetzt und die ^{3}H-Aktivität im Packard-Szintillationszähler 3375 bestimmt.

d) Chromatographie an Succinyl-cAMP-aminopentyl-Sepharose 4B

Der Zellrasen von 50 Kulturflaschen (5×10^8 Zellen) wurde mit PBS-Mercaptoäthanol, pH 7,2, abgekratzt und die Zellen niedertourig abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 15 ml PBS-Mercaptoäthanol (10^{-3}M), pH 7,2, EDTA 10^{-3}M aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Zellen nach Auftauen im Homogenisator aufgebrochen. Nach Zentrifugation des Homogenates (1 h, 40 000 rpm; Spinco, Rotor SW 65) wurde im Überstand der Proteingehalt nach Murphy u. Kies (74) bestimmt und dieser dann auf die Säule aufgetragen. Mit 2 l PBS-Mercaptoäthanol (pH 7,2) wurde gewaschen und zuerst mit 200 ml 0,01 M Phosphat, pH 7,2, 1 M NaCl eine Proteinfraktion eluiert. Anschliessend wurden 5 ml 5×10^{-4}M cAMP + 500 ul ^{3}H cAMP (0,25 mCi, spez. Aktivität 24,1 Ci/mM; NEN) in 0,01 M Phosphat, pH 7,2, 1 M NaCl auf die Säule gegeben und dann weiterhin mit 0,01 M Phosphat, pH 7,2, 1 M NaCl eluiert. Der Protein- sowie der radioaktive Gipfel wurden unter häufigem Pufferwechsel gegen 0,01 M Phosphat, pH 7,2, dialysiert. Von dem radioaktiven Material waren nach dem Dialysieren noch 2 % der ursprünglichen ^{3}H-Aktivität vorhanden. Die dialysierten Substanzen wurden lyophilisiert.

e) Charakterisierung des radioaktiven Eluats

Biogel P-10, P-60, P-100 und P-150 (Bio-Rad) wurden mit 0,02 M Tris HCl, pH 7,5, 0,001 M Dithioerythrit (Serva, Heidelberg) äquilibriert. Das radioaktive Lyophilisat wurde im selben Puffer aufgenommen, in Aliquots auf die verschiedenen Biogel-Säulen (Ø 1 cm /1 m Länge) aufgetragen und die Proteine mit dem genannten Puffer eluiert. Das Ausschlussvolumen wurde mit Dextranblau festgelegt. Die Fraktionen, in denen cAMP eluiert wurde, waren mit ^{3}H-cAMP bestimmt worden.

6. Proteinkinasen

a) Isolierung von Kinasen aus Fibroblasten

Um die Frage zu klären, ob das radioaktive Protein (5a) die regulative Untereinheit der löslichen Proteinkinase ist, mussten aus den Fibroblasten Kinasen isoliert werden (75).

Ungefähr 10^{9} Zellen wurden in N_2-flüssig eingefroren und nach Auftauen im Potter-Homogenisator zertrümmert. Anschliessend wurde das Homogenat bei 40 000 rpm (Spinco, Rotor SW 50), zentrifugiert. Vom Überstand wurden 14 ml mit 4,4 g Ammoniumsulfat versetzt. Nach 1 Std wurde 10 min bei 25 000 rpm (Spinco, Rotor 30c) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml 0,02 M Tris, pH 7,4, 0,001 M Dithioerythrit aufgenommen und ausgiebig gegen diesen Puffer dialysiert. Das dialysier-

te Material wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2,4x7cm; Serva, Heidelberg), die vorher mit 0,02 M Tris, pH 7,4, 0,001 M Dithioerythrit äquilibriert wurde, aufgetragen; dann wurde mit 100 ml dieses Puffers gewaschen und anschliessend die Enzyme mit einem KCl-Gradienten (0-0,2 M) eluiert. Das Elutionsvolumen betrug 300 ml. Die Kinaseaktivitäten wurden bestimmt, indem der Einbau von ^{32}P in Histon verfolgt wurde.

Der Inkubationsansatz enthielt:

10 µl 2,5 Tris/HCl, pH 7,5, 0,4 M $MgCl_2$
10 µl lyophilisiertes Histon (40 mg/ml; Sigma)
10 µl cAMP ($2x10^{-2}$M; Boehringer Mannheim)
200 µl Enzymextrakt
3 µl γ-^{32}P-ATP (spez.Akt. 4,7 Ci/mMol; NEN).

Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurden 200 µl 20%ige TCA + 50 µl ATP (1 mg/ml) hinzugefügt und die Suspension über Nitrocellulosefilter (0,45 µ Porenweite, Ø 2,5 cm) gesaugt. Kontrollen waren Inkubationsansätze ohne Enzymextrakt bzw. mit Serumalbumin (100 γ/ml). Nach dem Trocknen der Filterrondelle wurden 5 ml Toluol-haltige Zählerflüssigkeit zugegeben und im Packard-Szintillationszähler 3375 die ^{32}P-Aktivität bestimmt.

b) Charakterisierung der Kinase 1 und 2

Je 2 mg Kinase 1 und 2 (Proteinbestimmung nach Murphy und Kies; 74) wurden an Succinyl-cAMP-aminopentyl-Sepharose 4B, wie unter 5d beschrieben, chromatographiert. Die Gipfel, die die Radioaktivität enthielten, wurden ausgiebig gegen 0,02 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,001 M Dithioerythrit dialysiert und anschliessend lyophilisiert.

Jeweils 250 µg des Lyophilisats von Kinase 1 und 2 wurden in wenig Puffer gelöst, auf eine Biogel P-150-Säule (Ø 1 cm, 1 m Länge) aufgetragen und analog 5e die Proteine eluiert.

Schliesslich wurde noch eine Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation (75) der Kinase 1 und 2 und des "löslichen cAMP-Bindungsproteins" (5d) durchgeführt. 0,2 ml (1 mg/ml) Protein + 100 µl ^{3}H-cAMP ($0{,}87 \times 10^{-12}$ Mol, spez. Aktivität 22,1 Ci/mMol; NEN) wurden 1 Std bei 0°C inkubiert und dann vorsichtig über 5 ml eines 5-20proz. Sucrosegradienten geschichtet. Die Sucrose war in 0,02 M Tris x HCl, pH 7,2, 0,001 M Dithioerythrit gelöst. Nach 15-stündiger Zentrifugation bei 49 000 rpm und 4°C (Rotor SW 50, Beckman Ultrazentrifuge L-2) wurden die Becher unten mit einer langen Kanüle angestochen und Fraktionen mit jeweils 3 Tropfen aufgefangen.

Die cAMP-bindende Aktivität wurde mit der Millipore-Filter-Technik (75) bestimmt. Zu den einzelnen Fraktionen wurde $MgCl_2$ (Endkonzentration 10 mM) gegeben, und anschliessend wurden sie über Millipore-Membranen (0,45 µ Porenweite, Ø2,5 cm; Fa. Sartorius, Göttingen) gefiltert. Die Rondelle wurden mit eiskaltem Puffer (0,02 M TrisxHCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$) nachgewaschen. Zuvor waren die Filter in demselben Puffer eingeweicht worden. Die Radioaktivität wurde in Toluol-haltiger Szintillatorflüssigkeit im Packard-Szintillationszähler nach dem Trocknen der Filter gemessen.

III. Ergebnisse

Wie schon in der Einleitung erwähnt, fällt der cAMP-Gehalt der embryonalen Rattenfibroblasten nach Stimulierung mit Kälberserum innerhalb der ersten 10 min auf etwa 20 Prozent des Ausgangswertes ab(18, 43). Für diesen Effekt kommen 2 Mechanismen in Frage. Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung der cAMP-metabolisierenden Enzymsysteme, die andere ein verstärktes Ausströmen von cAMP aus der Zelle. Wie in der Literatur beschrieben (54, 76-78), kann bei einer Reihe von Zellinien cAMP in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Daher wurde untersucht, ob embryonale Rattenfibroblasten sich analog verhalten.

1. Ist der Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Abgabe des Nukleotids ins Kulturmedium bedingt?

Der cAMP-Gehalt von stimulierten und nicht stimulierten Zellen und von deren Kulturmedien wurde durch eine Doppelmarkierungstechnik bestimmt. Die Adeninnukleotide waren durch Vorinkubation der Zellen mit ^{3}H-Adenosin markiert worden. Nach Äquilibrierung wurde das Medium abgegossen und die eine Hälfte der Kulturen durch Zugabe von Kulturmedium, das 10 % Kälberserum und ausserdem ^{14}CcAMP enthielt, stimuliert. Die andere Hälfte erhielt weiterhin serumfreies Medium,

dem ebenfalls ^{14}C-cAMP zugesetzt worden war. 30 Minuten später wurden die Medien abgegossen und die Nukleotide aus den Zellen mit eiskalter Perchlorsäure extrahiert, in der ^{14}C-cAMP gelöst war. Nach Vorreinigung über Dowex 50 und Dowex 2 wurde das cAMP der Zellextrakte und Kulturmedien dünnschichtchromatographisch auf PEI-Cellulose isoliert und die ^{3}H/^{14}C-Verhältnisse im Packard-Szintillationszähler ermittelt.

Das Ergebnis eines charakteristischen Experiments ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Inkubation 30 min	Verhältnis ^{3}H-^{14}C-Aktivität cAMP des Kulturmediums	cAMP des Zellextraktes
+ Serum	0,72	7,1
-	0,72	25,4

Tabelle 2: Verhältnis ^{3}HcAMP/^{14}CcAMP im Kulturmedium und Perchlorsäure-Extrakt von embryonalen Rattenfibroblasten, die 18 Stunden in serumfreiem Medium vorinkubiert, dann für 3 Stunden mit ^{3}H-Adenosin markiert und für 30 min mit bzw. ohne Serum nachinkubiert worden waren. Dem Kulturmedium (während der 30 min Stimulierung) und der Perchlorsäure für die Extraktion waren jeweils gleiche Mengen kaltes cAMP und ^{14}C-cAMP zugesetzt worden.

Da stets gleiche Mengen ^{14}C-cAMP dem Kulturmedium bzw. der Perchlorsäure zugesetzt wurden, sind die ^{3}H-/^{14}C-Quotienten den ^{3}H-cAMP-cAMP-Konzentrationen direkt proportional. Hieraus ergibt sich, dass 30 min nach Stimulierung durch Kälberserum die ^{3}H-cAMP-Konzentration in den Zellen nur noch 28 Prozent des Kontrollwertes, bei dem die Zellen in Medium ohne Serum inkubiert wurden, beträgt. Von den nicht stimulierten Zellen wurden während der 30 min weniger als 3 Proz. des intrazellulären ^{3}H-cAMP ins Kulturmedium abgegeben. Dieser Wert erhöhte sich bei den stimulierten Zellen nicht.

Aus drei verschiedenen Experimenten ergaben sich folgende Mittelwerte mit Standardabweichungen: Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels 30 min nach Stimulierung 69 $\pm$ 6 Prozent; Abgabe von cAMP ins Kulturmedium während dieser Zeit 3,0 $\pm$ 1,2 Prozent. Somit muss praktisch die gesamte Menge des verschwindenden cAMP in den Zellen enzymatisch abgebaut worden sein. Dies ist wiederum nur möglich durch eine sehr rasche Veränderung der Aktivitäten des cAMP-metabolisierenden Enzymsystems (Phosphodiesterasen und Adenylatcyclase).

2. Phosphodiesterase-Aktivitäten

Wie einleitend diskutiert, kann eine Abnahme der cAMP-Gleichgewichts-Konzentration durch Aktivierung der Phosphodiesterasen, Hemmung des Adenylatcyclase-

Systems bzw. gleichzeitige Beeinflussung beider Enzymsysteme erfolgen. Eine Erhöhung der Phosphodiesterase-Aktivität infolge Neusynthese von Enzymmolekülen kann wegen des sehr raschen Abfalls der intrazellulären Konzentration von cAMP ausgeschlossen werden (45, 46). Die Aktivierung der Phosphodiesterasen müsste deshalb durch Effektoren erfolgen, die nach Stimulierung in die Zellen gelangen oder aber erst durch den Einfluss des Serums im Zellinneren freigesetzt werden.

Von mehreren Autoren (79-84) sind in verschiedenen Geweben zwei Phosphodiesterase-Aktivitäten beschrieben worden. Russell et al. (85) fanden in der Rattenleber sogar drei verschiedene cyclische Nukleotid-spaltende Phosphodiesterasen, von denen eine spez. cGMP, eine andere cAMP und die restliche cGMP und cAMP metabolisiert. Ausser 3'5'cAMP, 3'5'cGMP und 3'5'cdAMP ist bisher kein weiteres cyclisches Nukleotid physiologisch nachgewiesen (86).

Bei embryonalen Rattenfibroblasten konnten zwei verschiedene cAMP-spaltende Phosphodiesterase-Aktivitäten nachgewiesen werden, die sich in ihren kinetischen Daten erheblich unterscheiden.

a) Phosphodiesterase mit hoher Michaelis-Konstanten

Die cAMP-Metabolisierung durch die Phosphodiesterasen ist eine Bisubstratreaktion:

cyclisches AMP^- + H_2O $\xrightarrow{\text{Phosphodiesterase}}$ 5'-AMP^{2-} + H^+

Die H_2O-Konzentration ist konstant, so dass $K_{M\ app}$- und V_{max}-Werte nach dem einfachen Lineweaver-Burk Diagramm berechnet werden konnten. Dies geschah mit Hilfe eines Programmes von Herrn Dipl.Biochem.H.R. Karfunkel.

Für die Phosphodiesterase mit hoher Michaeliskonstanten (PDE II) konnten folgende Werte errechnet werden (Abb. 8)

$K_{M\ app} = 9,4 \pm 2,5 \times 10^{-4}$ M; $V_{max} = 3,6 \pm 0,6$ nMol/10^6Z. x 10 min

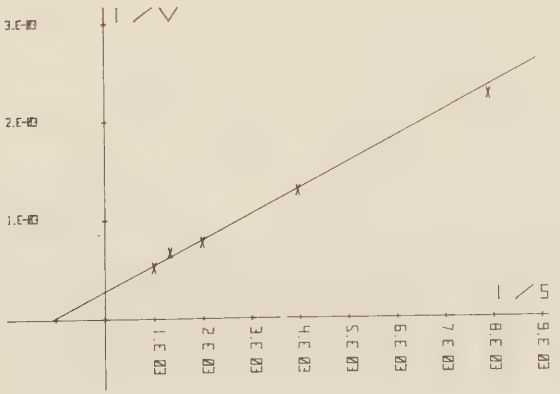


Abb. 8 Lineweaver-Burk-Diagramm der PDE II mit hoher Michaelis-Konstanten ($K_{Mapp} = 9,4 \times 10^{-4}$M; $V_{max} = 3600$ pMol/10^6Zellen x 10 min)

b) Phosphodiesterase mit niederer Michaeliskonstanten (PDE I)

Die Phosphodiesterase mit niederer Michaeliskonstanten hat folgende kinetische Daten (Abb. 9):
$K_{M\ app}$= 5,8 ± 0,8 x 10^{-6}M, V_{max} = 40 ± 4,5 pMol/10^6Z. x 10 min

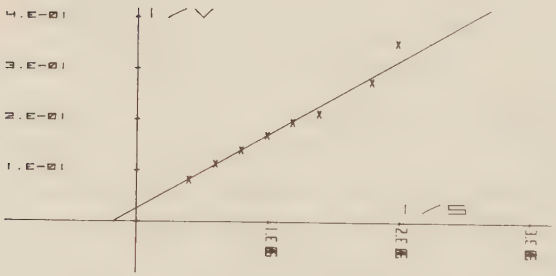


Abb. 9 Lineweaver-Burk-Diagramm der cAMP-spaltenden Phosphodiesterase aus embryonalen Rattenfibroblasten mit niederer Michaeliskonstanten, PDEI (K_{Mapp} = 5,8 x 10^{-6} M und V_{max} = 40 pMol/10^6 Zellen x 10 min)

Enzyme mit ähnlichen kinetischen Daten sind von anderen Autoren in mehreren Säugetierzellinien nachgewiesen worden (79, 83, 87-91).

In serumfreiem Medium häufen sich die embryonalen Rattenfibroblasten in der G_1-Phase des Zellzyklus an, wobei die intrazelluläre cAMP-Konzentration ansteigt

(37, 43). Die Untersuchung der PDE I in Homogenaten von Zellen, die 24 Std in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, ergibt eine geringfügige Erhöhung der Michaelis-Konstanten und der Maximalgeschwindigkeit (Abb.10). K_{Mapp} = 1,37 ± 0,5x10^{-5}M, V_{max}= 74 ± pMol/10^6 Zellen x 10 min

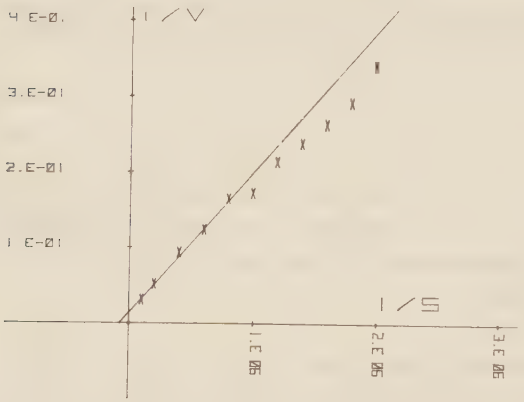


Abb. 10 Lineweaver-Burk-Diagramm der PDE I aus Zellen, die in serumfreiem Medium inkubiert worden waren; K_{Mapp}=1,4x10^{-5}M; V_{max}= 70 pMol/10^{6}Zellen x 10 min.

Die cAMP-Konzentration in embryonalen Rattenfibroblasten beträgt etwa 1x10^{-6}M (43), wenn man für 10^6 Zellen ein Volumen von 2 µl annimmt. Bei diesen Konzentrationen kann nur durch die Phosphodiesterase mit niederer Michaelis-Konstanten ein messbarer Umsatz erfolgen. Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb an diesem Enzymsystem

durchgeführt, das im folgenden als PDE I bezeichnet wird. Etwa 86 % der Gesamtaktivität von PDE I sind nicht membrangebunden, da sich diese Enzymaktivität bei einstündigem Zentrifugieren bei 130 000 x g nicht sedimentieren lässt (Tab. 3)

	PDE I cAMP-Umsatz pMol/10^6Zx10 min	Prozent des Ges.Umsatzes
Membran-gebunden	6,2	14
Nicht membran-gebunden	37,4	86

Tab. 3 Phosphodiesterase-Aktivität (PDE I) bei embryonalen Rattenfibroblasten. Prozentuale Verteilung der membrangebundenen und löslichen Anteile.

Da Phosphodiesterasen durch Nukleotidtriphosphate, anorganisches Phosphat, Pyrophosphat (92), Citrat (93), Adenosin (94), Inosin und L-Desoxyadenosin (95) gehemmt werden, wurden die Zellhomogenate stets ausgiebig dialysiert. Diese physiologischen Komponenten spielen vielleicht für den Kontrollmechanismus der Phosphodiesterasen in vivo eine wichtige Rolle.

Dialysierte man den Zellextrakt gegen EDTA, so konnte mit den beschriebenen Methoden keine Enzymaktivität gemessen werden. Substituierte man wieder Mg^{2+}(10^{-3}M), so liess sich die Aktivität bis zu 20 % zurückgewinnen (Kontrollwerte ergaben Experimente mit den gleichen Zellhomogenaten, die gegen Puffer ohne EDTA dialysiert worden

waren). Nach (96) sollte durch die Mg^{2+}-Ionen-Zugabe die Enzymaktivität wieder vollständig zurückerhalten werden.

c) Einfluss verschiedener Effektoren auf die PDE I-Aktivität

Stimuliert man Zellen, die 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten worden waren, mit Serum und misst nach mehreren Zeitabständen die Phosphodiesteraseaktivität in den Zellhomogenaten, so findet man nach 30 min eine Zunahme der Enzymaktivität gegenüber den Kontrollzellen ohne Serumzusatz um den Faktor 2 (Abb. 11).

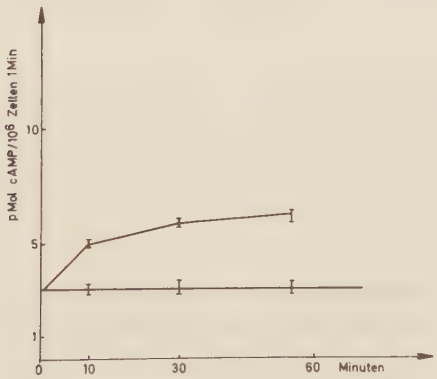


Abb. 11 cAMP-spaltende Phosphodiesterase-Aktivität im Überstand homogenisierter Zellen. Die Kontrollen hatten kein Serum im Kulturmedium, die anderen Zellen waren durch Zusatz von Kälberserum zum Zeitpunkt 0 stimuliert worden.

Die Phosphodiesterase-Aktivität im Serum ist so gering (> 5 % der Aktivität des Zellhomogenats), dass sie als additive Komponente ausscheidet.

Die Phosphodiesterase wird in vitro nicht durch dialysiertes fötales Kälberserum in seiner Aktivität beeinflusst (Tab. 4).

	PDE I c-AMP-Umsatz pMol/10^6Zellen x 10 min
Ohne Serum	39 ± 0
10 % dialysiertes fötales Kälberserum	40,5 ± 1,0

Tab. 4 Einfluss von dialysiertem fötalem Kälberserum auf PDE I in vitro

Bei transformierten Zellen konnte nach Stimulierung mit Serum keine Aktivitätszunahme der PDE festgestellt werden; bei mehreren Versuchen zeichnete sich eher ein leichter Abfall ab.

Die Phosphodiesterase-Aktivität lässt sich in vitro durch Mg^{2+}-Ionen steigern. Wie aus Abb. 12 hervorgeht, ist die Enzymwirkung bei 10^{-3}M Mg^{2+} und höher optimal. Wenn nicht anders beschrieben, wurden sämtliche Phosphodiesterase-Teste bei dieser Mg^{2+}-Konzentration (10^{-3}M) durchgeführt.

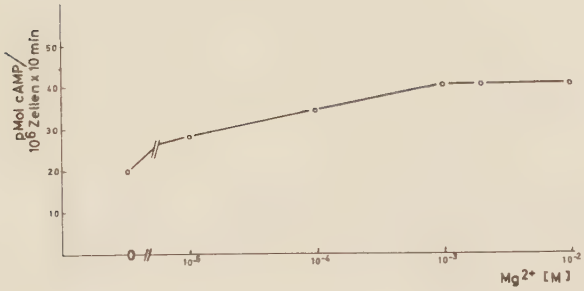


Abb. 12 Abhängigkeit der PDE I von der Mg^{2+}-Konzentration

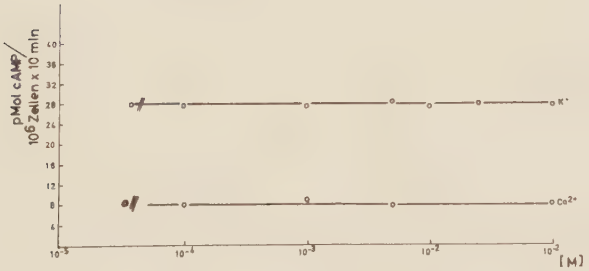


Abb. 13 Abhängigkeit der PDE I von der K^+-Konzentration (1×10^{-3} M Mg^{2+}) und der Ca^{2+}-Konzentration (ohne Mg^{2+})

K^+-Ionen haben bis zu physiologischen Konzentrationen keinen Einfluss, wenn das Enzym durch Magnesium aktiviert ist (Abb. 13). Ca^{2+}-Ionen (ohne Magnesium) steigern die basale Enzymaktivität ebenfalls nicht (Abb.13). Untersucht man den Einfluss von Ca^{2+}-Ionen auf die PDE bei optimaler Mg^{2+}-Konzentration so ist bis zu 10^{-4}M Ca^{2+} keine Aktivitätsänderung nachweisbar; bei höheren Konzentrationen steigt dann die Aktivität an, erreicht bei 5 x 10^{-4}M ein Maximum und fällt bei 10^{-3}M unter die Basalaktivität (Abb.14).

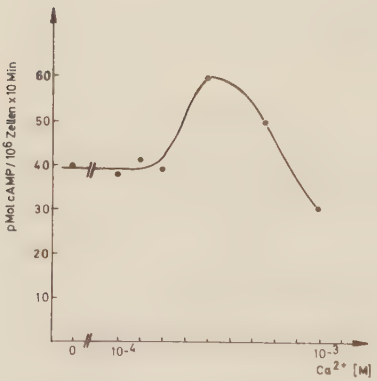


Abb.14
Abhängigkeit der PDE von Ca^{2+} bei optimaler Mg^{2+}-Konzentration (10^{-3}M)

Kakiuchi et al. (97) beschrieben eine Ca^{2+}-abhängige Phosphodiesterase in Rattenhirnextrakten. Das Enzym benötigt jedoch zur maximalen Stimulierung viel geringere Ca^{2+}-Konzentrationen (pCa^{2+} 5,9 - 4,9). Ausserdem ist zur Aktivitätssteigerung ein hitzestabiler, nicht dialysierbarer Faktor (PAF) erforderlich.

Die kinetischen Daten in Gegenwart von 5×10^{-4} M Ca^{2+} der PDE I aus Rattenfibroblasten zeigten, dass die Michaelis-Konstante sich nicht verändert, dass aber V_{max} deutlich erhöht wird (Abb. 15).

$K_{Mapp} = 4,9 \pm 0,7 \times 10^{-6}$M, $V_{max} = 287 \pm 25$ pMol/10^6Zellen x 10 min.

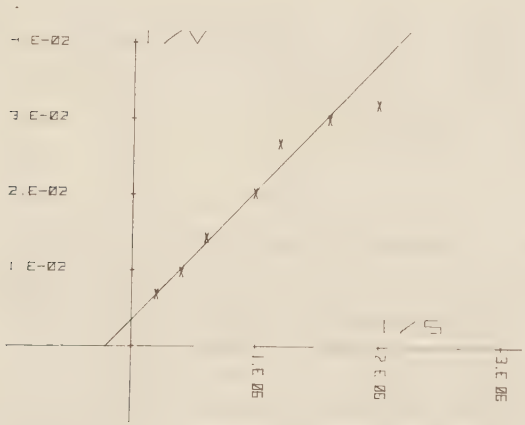


Abb. 15 Lineweaver-Burk-Diagramm nach Aktivierung der PDE I durch 5×10^{-4}M Ca^{2+} ($K_{Mapp} = 4,9 \times 10^{-6}$ M, V_{max} = 290 pMol/10^6 Zellen x 10 min)

Der Einfluss höherer Ca^{2+}-Konzentrationen (10^{-3} M) auf K_{Mapp} und V_{max} konnte nicht gezeigt werden, da die Enzymreaktion nicht nach der einfachen Michaelis-Menten-Kinetik erfolgte (Abb. 16).

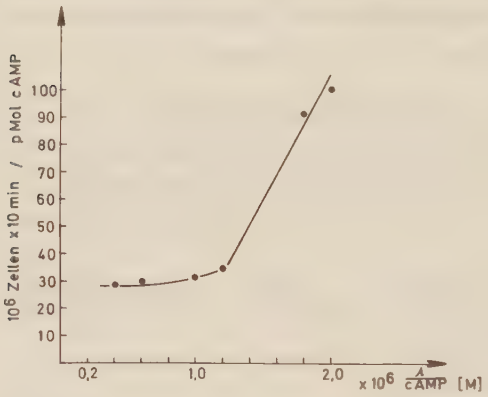


Abb.16 Lineweaver-Burk-Diagramm der PDE I nach Hemmung durch 10^{-3}M Ca^{2+}

Auch durch cGMP kann die PDE I in vitro aktiviert werden, wobei die maximal wirksame Konzentration von 10^{-11}M ausserordentlich gering ist (Abb.17). Brooker, Thomas u. Appleman (98) zeigten, dass cGMP kein kompetitives Substrat für die cAMP-spaltende Phosphodiesterase aus Rattenhirn ist. Ähnliche Befunde sind von Goldberg et al. beschrieben (99). Sutherland et al. (100, 101) zeigten bei einer Reihe von Geweben, dass die enzymatische cAMP-Hydrolyse durch weniger als 0,08 µMol cGMP stimuliert wird. Konzentrationen grösser

als 50 µM cGMP wirken hemmend auf die cAMP-PDE-Aktivität aus Rattenleber.

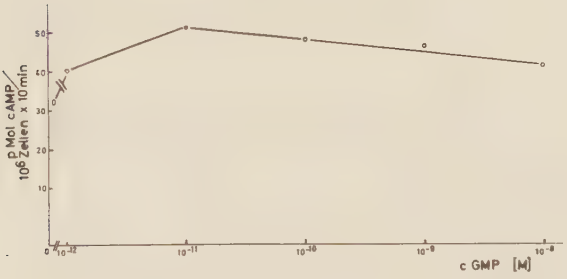


Abb. 17 Abhängigkeit der PDE I-Aktivität von der cGMP-Konzentration bei optimaler Mg^{2+}-Konzentration

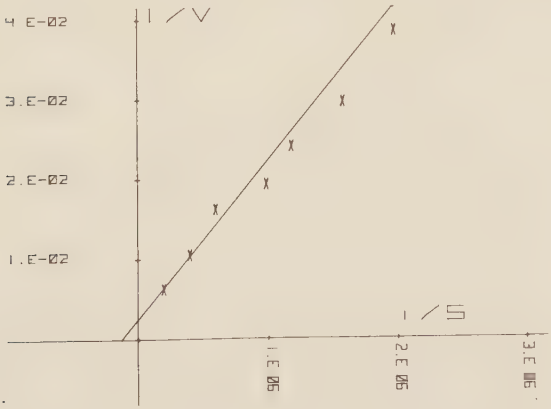


Abb. 18 Lineweaver-Burk-Diagramm nach Aktivierung der PDE I durch $1x10^{-11}$M cGMP (K_{Mapp}=8,2x10^{-6}M V_{max}=410 pMol/10^6 Zellen x 10 min)

Wie im Falle des Calciums wird bei der Beeinflussung von cGMP auf die Phosphodiesterase I aus Rattenfibroblasten die Michaelis-Konstante nicht signifikant verändert, wohl aber die maximale Umsatzgeschwindigkeit erhöht (Abb. 18). $K_{Mapp} = 8{,}2 \pm 2{,}0 \times 10^{-6}$M; V_{max} 413 ± 73pMol /10^6 Zellen x 10 min.

Sehr viele in vivo-Experimente können nur mit dem chemisch synthetisierten cAMP-Derivat cyclisches N^6,O^2-Dibutyryl-3'5'-Adenosinmonophosphat durchgeführt werden, da es die Zellmembran im Gegensatz zu cAMP passieren kann. In der Zelle wird bu_2cAMP dann wahr-

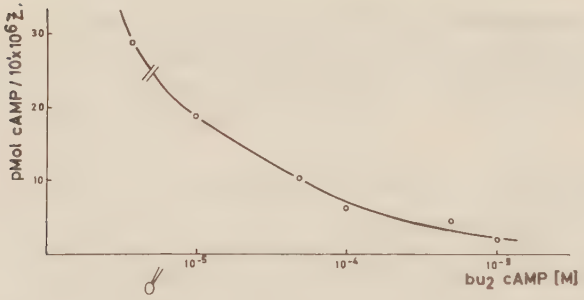


Abb.19 Hemmung der PDE I durch N^6,O^2-Dibutyryl-cAMP

scheinlich zu N^6-monobutyryl-cAMP abgebaut, das als eigentlicher intrazellulärer cAMP-Substituent wirken soll (102). Bei Knochenzellen der Ratte hemmt das bu_2cAMP die Phosphodiesterase (103). Dasselbe konnte

auch für die PDE I der embryonalen Rattenfibroblasten gezeigt werden, wie aus Abb. 19 zu entnehmen ist; bei einer bu_2cAMP-Konzentration von $2x10^{-5}$M wird das Enzymsystem in vitro etwa 50 % gehemmt, bei 10^{-3}M bu_2cAMP ist keine Phosphodiesteraseaktivität mehr messbar.

d) Abhängigkeit der Phosphodiesteraseaktivität vom Alter der Zellen

Da die Phosphodiesteraseaktivität von Zellhomogenat zu Zellhomogenat trotz gleicher Testbedingungen schwankte, wurde die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit des Alters bestimmt. Früher war schon gezeigt worden (104), dass mit steigendem Alter der Kulturen die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen stark abnimmt. Nach den einleitend erwähnten Untersuchungen, bei denen ein reziproker Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und intrazellulärer cAMP-Konzentration festgestellt worden ist, dürfte in diesem Falle auch ein Anstieg des cAMP-Gehaltes zu erwarten sein (d.h. z.B. Phosphodiesterase-Aktivitätsabnahme). Mehrere Experimente zeigten, dass nach der 2. Passage ein Maximum der Enzymaktivität vorhanden ist. Danach fällt die Aktivität wieder ab und beträgt nach 10-12 Passagen (ca. 50-70 Tage nach Anlegen der Kultur) nur noch ein Drittel des Maximalwertes (Abb. 22).

Die Aktivitätsabnahme mit dem Alter der Zellen ist jedoch nicht charakteristisch für die Phosphodiesterase.

Gleichsinnig verhalten sich auch die löslichen Enzyme Lactatdehydrogenase, Glukose-6-P-Dehydrogenase und Glutamatdehydrogenase sowie das strukturgebundene Enzym Succinatdehydrogenase. Die Aktivitäten sind unmittelbar nach Explantation der Zellen am höchsten und nehmen ab der 2. bzw. 3. Passage stark ab(Abb. 20).

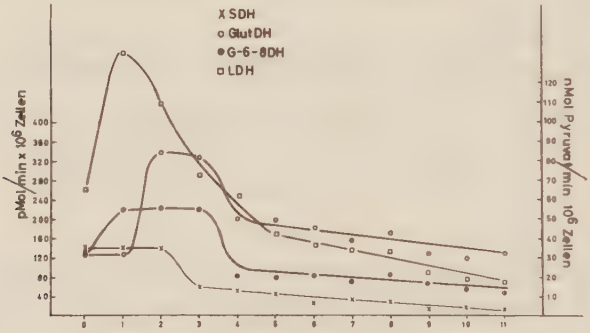


Abb. 20 Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Anzahl der Passagen in Zellkultur
x——x Succinatdehydrogenase (SDH)
o——o Glutamatdehydrogenase (Glut-DH)
•——• Glukose-6-P-Dehydrogenase (G-6-P-DH)
□——□ Lactatdehydrogenase (LDH)

Eine Steigerung der Phosphodiesterase-Aktivität von Zellen der 2. Passage war weder mit 5 x 10^{-4}M Ca^{2+} noch mit cGMP möglich. So wurden alle bisher beschriebenen kinetischen Untersuchungen der PDE I mit Zellen der 4. - 7. Passage durchgeführt.

Die Aktivitätsabnahme bei den Zellen höherer Passagen ist nicht mit einer Zunahme von K_{Mapp} oder einer Abnahme von V_{max} verbunden. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, wird sowohl V_{max} als auch die Affinität des Enzyms zum Substrat erhöht. K_{Mapp}=1,3±0,2 x 10^{-6}M; V_{max}= 101±8,4pMol /10^6 Zellen x 10 min.

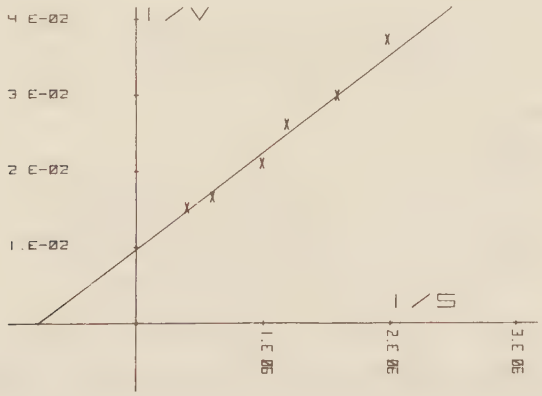


Abb. 21 Lineweaver Burk-Diagramm der PDE ± aus Zellen, die 70 Tage in Kultur gehalten waren. K_{Mapp}=1,3 x 10^{-6}M, V_{max}=101 pMol /10^6 Zellen x 10 min

Um das Phänomen der Aktivitätsabnahme der PDE I bei alten Zellen besser verstehen zu können, wurde ein Kombinationsversuch mit Zellextrakten verschiedener Passagen durchgeführt. Nimmt man an, dass die Phosphodiesterase durch einen Proteinaktivator (93) beeinflusst wird, der den Zellen nur zu Beginn des Wachstums zur Verfügung

steht, so müsste dieser, wenn er nur im Verhältnis 1 : 1 stimuliert, im Überschuss vorhanden sein und so das Enzym älterer Zellen aktivieren können.Wie Tab.5 zeigt, ist dies jedoch nicht der Fall; denn bestimmt man den Umsatz der Phosphodiesterase 2. und 12. Passage und mischt dann die Extrakte 1: 1, so liegt die Aktivität in der Mitte der Einzelwerte.

	Phosphodiesterase I cAMP-Umsatz pMol/10^6Zell x 10 min
2. Passage	52
12. Passage	21
2.+12.Passage	34

Tab. 5 Kombination von Phosphodiesterasen verschiedenen Alters im Verhältnis 1 : 1

Im Regelfall proliferieren embryonale Rattenfibroblasten nach 10-12 Passagen nur noch langsam. Bei zwei Kulturansätzen jedoch nahm die Proliferationsgeschwindigkeit mit der Zahl der Passagen nur geringfügig ab; nach der 11. bzw. 16. Passage (70 bzw. 95 Tage nach Anlegen der Kultur) fiel die Phosphodiesteraseaktivität in den Zellen plötzlich um mehr als die Hälfte ab(Abb.22), und die Zellen zeigten im Vergleich zu den ursprünglich langgestreckten Fibroblasten ein epitheloides Aussehen. Die Teilungsrate der Zellen nahm stark zu. Es war eine permanente Zellinie entstanden. Interessant dabei dürfte die Beobachtung sein, dass die Phosphodiesterase nach der Transformation in vitro Ca^{2+}-unabhängig geworden war.

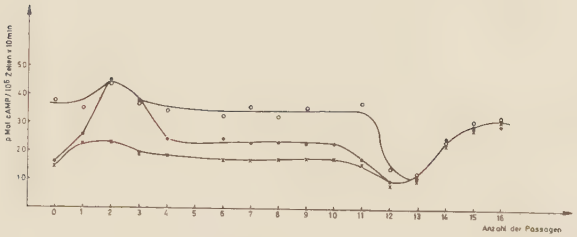


Abb. 22 Abhängigkeit der PDE von der Anzahl der Passagen in Zellkultur
●——● PDE, 10^{-3}M Mg^{2+}
o——o PDE, 10^{-3}M Mg^{2+} + 5 x 10^{-4}M Ca^{2+}
x——x PDE, 10^{-3}M Mg^{2+} + 10^{-3}M Ca^{2+}

e) Kinetische Daten der Phosphodiesterase permanent wachsender Zellen

In Homogenaten permanent wachsender Zellen (49) konnte nur eine Phosphodiesterase(mit niederem K_M-Wert) gefunden werden, der von der Michaeliskonstanten der PDE I aus embryonalen Rattenfibroblasten nicht signifikant verschieden ist: K_{Mapp} = 4,6 ± 0,5 x 10^{-6}M, V_{max} = 82,5 pMol/10^6Zellen x 10 min (Abb. 23). Eine Phosphodiesterase-Aktivität mit hohem K_{Mapp} war nicht nachweisbar.

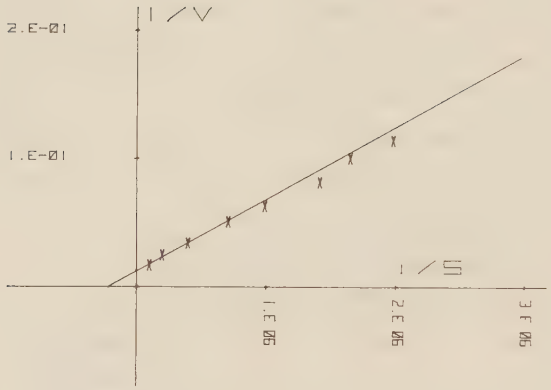


Abb. 23 Lineweaver-Burk-Diagramm der Phosphodiesterase permanent wachsender Zellen (K_{Mapp}= 4,6x10^{-6}M, V_{max}=83pMol/10^{6}Zellen x 10 min)

Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Pastan et al. (83) überein. Clark et al. (105) konnten in neoplastischen Leberzellen eine PDE mit hohem K_{Mapp} finden, doch war die Enzymaktivität im Vergleich zu normalen Leberzellen stark vermindert.

Permanent wachsende Zellen sind für mindestens 3 Generationen vom Serumzusatz zum Kulturmedium unabhängig (49). Die Untersuchung der PDE in Homogenaten von permanent wachsenden Zellen, die in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, ergibt sich eine geringe Erniedrigung der Michaelis-Konstanten (1,2 $\pm$ 0,4 x 10^{-6}M) und der Maximalgeschwindigkeit

(24 ± 4,0 pMol/10 min x 10^6Zellen); Abb. 24.

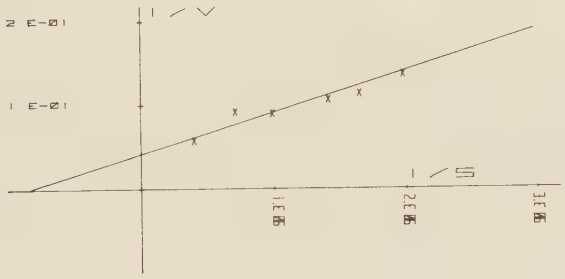


Abb. 24 Lineweaver-Burk-Diagramm der PDE permanent wachsender Zellen, die in Medium ohne Serum inkubiert worden waren
(K_{Mapp}=1,2 x 10^{-6}M, V_{max}= 24 pMol/10^6Zellen x 10 min)

Alle kinetischen Daten der untersuchten Phosphodiesterasen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

	$K_{Mapp} \pm SA$ [M]	V_{max} (pMol/10^6 Z. x 10 min)
PDE II	$9,4 \pm 2,5 \times 10^{-4}$	3 600
PDE I	$5,8 \pm 0,8 \times 10^{-6}$	40
PDE I (Zellen in serumfreiem Medium)	$1,4 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	70
PDE I (Zellen der 11.Passage)	$1,3 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	101
PDE I + 10^{-11}M cGMP	$8,2 \pm 2,0 \times 10^{-6}$	410
PDE I +5×10^{-4}M Ca^{2+}	$4,9 \pm 0,7 \times 10^{-6}$	290
Transformierte Zellen	$4,6 \pm 0,5 \times 10^{-6}$	80
Transformierte Zellen (in serumfreiem Medium)	$1,2 \pm 0,4 \times 10^{-6}$	24

Tabelle 6 Zusammenfassung der Michaelis-Konstanten (K_{Mapp}) und maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der Phosphodiesterase-Aktivitäten

3. Adenylatcyclase-Aktivität

Ausser den cAMP-spaltenden Phosphodiesterasen ist nur noch die Adenylatcyclase als cAMP-metabolisierendes Enzym bekannt.

Calcium, das nach Gabe von Serum zum Kulturmedium vermehrt in die Zelle eindringt, erwies sich als positiver Effektor der Phosphodiesterase mit niederem K_{Mapp}. Folglich wurde der Einfluss von Ca^{2+} auf die Adenylatcyclase-Aktivität untersucht.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe des cAMP-Antikörper-Bindungstestes bestimmt. Diese Methode (106) ist sehr spezifisch und empfindlich genug, cAMP im pMol-Bereich zu erfassen, trotz Anwesenheit hoher ATP-Konzentrationen (10^{-3}M). Ausserdem ist dieser Test dadurch ausgezeichnet, dass ein cAMP-Isolierungsschritt nicht notwendig ist und daher kein cAMP bei der Bestimmung verlorengehen kann.

In den Plasma-Membranen der embryonalen Rattenfibroblasten ist eine ATP-spaltende Nukleosid-Triphosphatase enthalten (107), die im Zellextrakt um den Faktor 3000 aktiver ist als die Adenylatcyclase. Um über-

haupt eine Cyclaseaktivität in vitro messen zu können, musste ein ATP-regenerierendes System im Testansatz vorhanden sein. ATP-Bestimmungen zeigten, dass die Konzentration des Trinukleotids während der Messung der Cyclase-Aktivität konstant blieb. Der ATP-Umsatz ist jedoch nur innerhalb eines sehr engen Bereiches der Enzymmenge proportional.

Ohne Fluorid-Ionen ist eine Basalaktivität der Adenylat-cyclase nicht messbar, so dass Natriumfluorid stets dem Inkubationsansatz zugesetzt werden musste. Ähnliche Befunde sind bereits beschrieben (108). Weidemann et al. (109) stellten fest, dass 10 mM NaF alle Adeninnukleotid-metabolisierenden Enzyme zu verschiedenem Grade hemmt, ausgenommen die Adenylat-cyclase. Danach soll die ATPase-Aktivität um 20 % und die 5'-Nukleotidase um 83 % verringert werden. Wie aus Tabell 7 hervorgeht, wird die ATPase-Aktivität embryonaler Rattenfibroblasten zu 30 % durch Fluorid gehemmt.

Die Adenylatcyclase-Aktivität in embryonalen Rattenfibroblasten ist zu 100 % an die partikulären Zellfraktionen gebunden. Auch nach 24-stündiger Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium konnte keine "lösliche" Cyclase nachgewiesen werden (Tab. 8).

Fluorid-Konzentration	ATP-Umsatz nMol/10^6 Zellen x min	Prozent Aktivität
0	12,7	100
10^{-2} M	8,9	70
$5x10^{-2}$ M	8,9	70

Tabelle 7 Hemmung der ATP-spaltenden Nukleosid-Triphosphatase durch Fluorid

	Adenylatcyclase, cAMP-Bildung pMol/10^6 Zellen x 10 min	
	serumfrei	10 % KS
Membrangebunden	22	26
Nicht membrangebunden	0	0

Tabelle 8 Prozentuale Verteilung der membrangebundenen und löslichen Anteile des Adenylatcyclase-Systems

a) Einfluss von Ca^{2+} auf die Adenylatcyclase-Aktivität

Das Adenylatcyclase-System der Parathyroiddrüsenzellen von Pferden (110) und Rattengehirnzellen (111) wird durch Ca^{2+} gehemmt. Analog ist der Befund bei embryonalen Rattenfibroblasten. Wie aus Abb. 25 hervor-

geht, ist bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M Ca^{2+} in vitro fast kein Einfluss auf die Bildung von cAMP festzustellen. Im Bereich zwischen 1,5 x 10^{-4}M und 5 x 10^{-4}M Ca^{2+} fällt jedoch die Aktivität auf weniger als 5 % des Ausgangswertes steil ab.

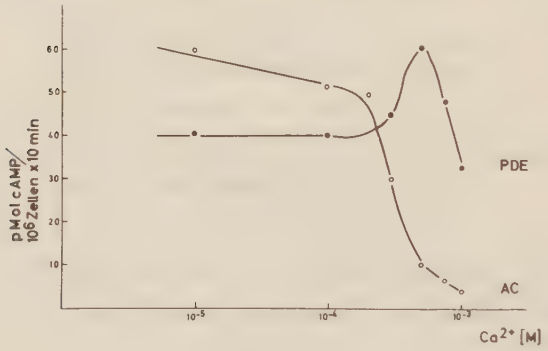


Abb. 25 Abhängigkeit der PDE I und der Adenylatcyclase von der Calcium-Konzentration
o——o Adenylatcyclase (AC)
•——• Phosphodiesterase I (PDE)

Calcium-Ionen bilden mit Fluorid einen Komplex. Daher musste ausgeschlossen werden, dass der Abfall der Aktivität durch Verminderung der Fluorid-Konzentration zustande kommt. Abb. 26 zeigt die Cyclase-Aktivität in Abhängigkeit von der Fluorid-Konzentration ohne Calcium sowie bei 3 x 10^{-4}M und 1 x 10^{-3}M Ca^{2+}.

Bei einer Fluorid-Konzentration von 10^{-2}M und 10^{-3}M Calcium würden selbst bei quantitativer Bildung von CaF_2 8,0 x 10^{-3}M F^- in der Lösung vorhanden sein. Bei dieser Fluorid-Konzentration ist das Enzym in Abwesenheit von Calcium beinahe ebenso aktiv wie bei 10^{-2}M.

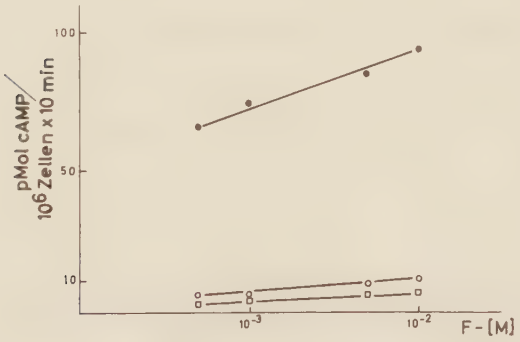


Abb. 26 Aktivität des Adenylatcyclase-Systems in Abhängigkeit von der Fluorid-Konzentration
●——● kein Calcium
o——o 5 x 10^{-4}M Calcium
□——□ 1 x 10^{-4}M Calcium

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Calcium-Ionen die ATPase-Aktivität gesteigert wird und so für die Cyclase kein Substrat mehr zur Verfügung steht (Abb. 27). Eine weitere Fehlermöglichkeit wäre die Hemmung des ATP-regenerierenden Enzymsystems durch Calcium. Nach (112) ist dies jedoch nicht der Fall, denn Calcium wirkt

sogar schwach stimulierend auf die Creatinkinase.

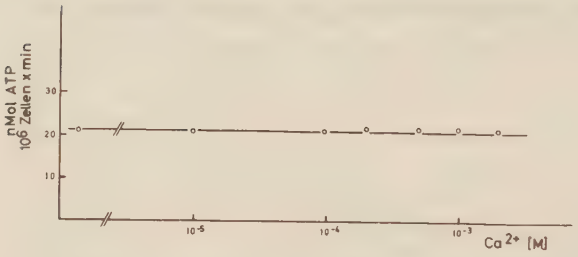


Abb. 27 Abhängigkeit der ATP-spaltenden Nukleosid-Triphosphatase von der Calcium-Konzentration

Mit 10^{-3}M EGTA kann die Calcium-Hemmung wieder vollständig aufgehoben werden, wie auch von anderen Autoren beschrieben ist (110). Aus Tabelle 9 geht hervor, dass die Hemmung durch Ca^{2+} (5×10^{-4}M) bei allen Mg^{2+}-Konzentrationen gleich hoch ist. Ca^{2+} kann also nicht kompetitiv Mg^{2+}-Ionen an deren Bindungsstelle verdrängen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit (110), ist jedoch zu (111) widersprüchlich. Demnach sollte eine kompetitive Hemmung des Adenylatcyclase-Mg^{2+}-Systems durch Ca^{2+} erfolgen.

	Adenylatcyclase/cAMP-Bildung pMol/10^6 Zellen x 10 min
$3{,}3 \times 10^{-3}$M Mg^{2+}	48,5
$3{,}3 \times 10^{-3}$M Mg^{2+} + 5×10^{-4}M Ca^{2+}	19,0
10^{-2}M Mg^{2+} + 5×10^{-4}M Ca^{2+}	17,5
2×10^{-2}M Mg^{2+} + 5×10^{-4}M Ca^{2+}	18,5

Tabelle 9 Ca^{2+} hemmt bei allen Mg^{2+}-Konzentrationen das Adenylatcyclase-System

b) Beeinflussung der Adenylatcyclase in vitro durch Serumfaktoren

Wie bei der Phosphodiesterase I findet auch bei der Adenylatcyclase in vitro keine direkte Beeinflussung durch Serumfaktoren statt (Tabelle 10). Solche Befunde dürfen bei strukturgebundenen Enzymen nicht ohne weiteres auf in vivo-Verhältnisse übertragen werden.

Die Adenylatcyclase ist als Membrankomponente eng mit Proteinen und Lipiden verknüpft (113). So kann eine Veränderung dieser Struktur die Spezifität des Enzyms

variieren. Ausserdem könnte das Enzym z.B. aus einer regulativen und katalytischen Untereinheit bestehen (114), wobei während der Präparation der Membranfragmente die regulative Untereinheit zerstört oder abgelöst wird.

	Adenylatcyclase cAMP-Bildung pMol/10^6Zellen x 10 min
Ohne Serum	35 ± 1,5
10 % dialysiertes fötales Kälberserum	38 ± 2,0

Tabelle 10 Einfluss von dialysiertem fötalem Kälberserum auf die Adenylatcyclase in vitro

Bei anderen Zellsystemen konnten Membranfragmente erhalten werden, deren Adenylatcyclasen noch auf Hormone ansprechen (115, 116).

c) Adenylatcyclase-Aktivität permanent wachsender Zellen

Die Adenylatcyclase-Aktivität scheint in transformierten Zellen (49) geringer zu sein als bei normalen Rattenfibroblasten. Unter den beschriebenen Messbedingungen in vitro war bei allen Versuchen die Enzymaktivität transformierter Zellen etwa um den Faktor zwei vermindert. Ähnliche Daten sind in der Literatur be-

schrieben (113, 117). Calcium-Ionen hemmen die Adenylatcyclase-Aktivität transformierter Zellen analog den Normalzellen (Abb. 28).

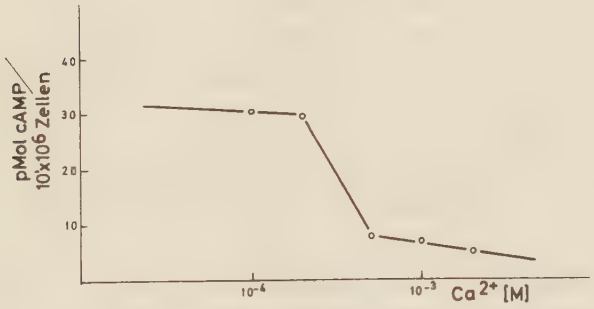


Abb. 28 Abhängigkeit der Adenylatcyclase transformierter Zellen von der Ca^{2+}-Konzentration

4. cAMP-bindende Proteine

In der Literatur sind bei Säugerzellen ausser den regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinasen keine weiteren löslichen cAMP-bindenden Proteine beschrieben. Die Affinitätschromatographie schien eine gute Möglichkeit zu sein, derartige bindende Proteine zu identifizieren, da nach Selinger et al.(118) die regulatorischen Untereinheiten der Kinasen weder mit hohen Salzkonzentrationen, Harnstoff, Puffer mit alkalischem pH noch mit 10^{-3}M cAMP von der cAMP-aminocapryl-Sepharose-Säule eluiert werden können. Da die Adenylatcyclase membrangebunden ist und nur der 200 000 g Überstand des Zellhomogenats für die Affinitätschromatographie verwendet wurde, schied auch dieses Enzym als Bindungskomponente aus. Die Phosphodiesterase-Aktivität wurde durch Zugabe von EDTA zum Zellextrakt gehemmt.

Ein weiteres Problem schien die Stabilität der "cAMP-Sepharose" zu sein, da die von Schwyzer et al. (73) synthetisierte cAMP-8-cysteamidocaprylamino-Sepharose nach 2 Stunden schon zu mehr als 50 % zerfallen war. Wie Abb. 29 zeigt, war die 2'-O-Succinyl-cAMP-aminopentyl-Sepharose über längere Zeit hinweg stabil.

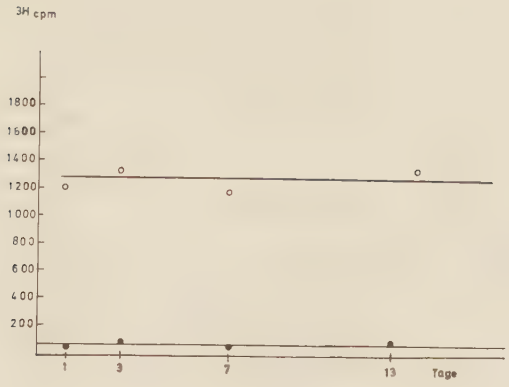


Abb. 29 Stabilität der 2'-O-Succinyl-cAMP-aminopentyl-Sepharose (bei pH 7,2) in Abhängigkeit der Zeit
o——o ^{3}H-Aktivität des Harzes
●——● ^{3}H-Aktivität im Überstand

Chromatographierte man nun die löslichen Proteine an 2'-O-Succinyl-cAMP-aminopentyl-Sepharose, so konnten sowohl mit 0,01 M Phosphat, pH 7,2, 1 M NaCl das bindende Protein I und mit 0,01 M Phosphat, pH 7,2, 1 M NaCl, 10^{-4}M cAMP das bindende Protein II eluiert werden. Bei nachfolgender Chromatographie an Biogel P-10, 60 und 100 wurden beide Proteine im Ausschlussvolumen eluiert, während sie bei P-150 erst 4 Fraktionen danach im Eluat identifiziert werden konnten.

Die beiden Proteine haben anscheinend gleiches Molekulargewicht, doch verschieden grosse Bindungskonstanten, wie aus Tab. 11 hervorgeht. Bei der Chromatographie an Biogel von Protein II verschiebt sich das Gleichgewicht:

$$cAMP + Protein \rightleftharpoons cAMP\text{-}Protein$$

stärker nach links als bei Protein I, so dass insgesamt weniger ^{3}H-cAMP an Protein II gebunden bleibt.

	^{3}H-cAMP / 100 µg Protein
Serumalbumin	-
Bindungsprotein I	500 cpm
Bindungsprotein II	8000 cpm

Tab. 11 ^{3}H-Aktivität des Proteins I und II nach Chromatographie an Biogel P-150. Beide Proteine waren mit je 200 ul ^{3}H-cAMP (463 mCi/mMol) bei 0°C 2 Std vorinkubiert worden.

Um zu prüfen, ob die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinasen von der Affinitätssäule eluiert werden können (118), wurden aus dem 200 000g-Überstand der Zellextrakte nach Lipmann (74) Proteinkinasen isoliert. Wie Abb. 30 zeigt, konnten zwei verschiedene Enzyme an DEAE-Cellulose mit einem linearen KCl-Gradienten (0-0,2 M) getrennt werden.

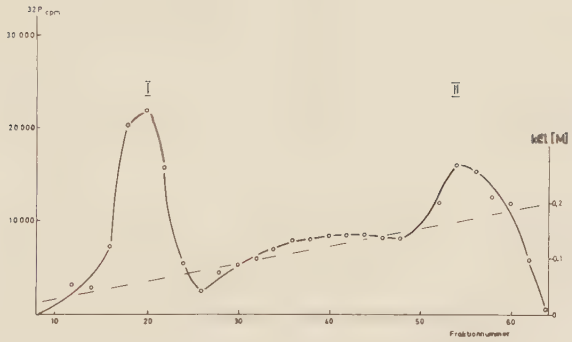


Abb. 30 DEAE-Cellulose-Chromatographie der Proteinkinasen aus Rattenfibroblasten. Die Enzyme wurden mit einem linearen 0-0,2 M KCl-Gradienten eluiert.

Nun konnten im Gegensatz zu (118) nach Chromatographie der Kinase 1 und 2 an 2'-O-Succinyl-cAMP-Sepharose 4B Proteine mit cAMP-Bindungsaktivität isoliert werden. Bei einer nachfolgenden Chromatographie an Biogel P-150 wurden die ^{3}H-cAMP-Radioaktivitäten der Kinase 1 und 2 in der gleichen Fraktion eluiert wie die bindenden Proteine I und II. Dabei war die spezifische Aktivität der Kinase 2 beträchtlich niedriger als die der Kinase 1, wie Tabelle 12 zeigt.

	^{3}H-cAMP / 100 µg Protein	
	Kinase 1	Kinase 2
Vor der Biogel-P-150-Chromatographie	980 cpm	750 cpm
Nach der Chromatographie	16 000 cpm	1 500 cpm

Tab. 12 ^{3}H-Aktivität der Kinase 1 und 2 vor und nach der Biogel-P-150 Chromatographie.

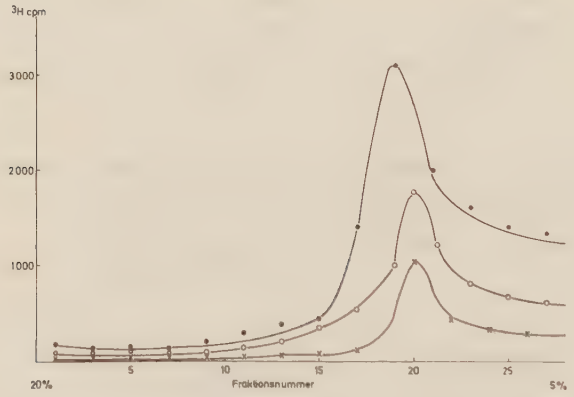


Abb. 31 Sucrosedichtegradientenzentrifugation
der Kinase 1 •——•
der Kinase 2 o——o und des
bindenden Proteins II x——x
Die cAMP-Bindung wurde mit der Millipore-Filter-Technik (75) bestimmt.

Weiterhin wurde ein 5-20% Sucrosedichtegradienten-zentrifugation bei 49000 rpm (15 h) durchgeführt. Wie aus Abb. 31 hervorgeht, findet man die Bindung von cAMP an Kinase 1 und 2 und an das bindende Protein II in den gleichen Fraktionen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der beschriebenen Art von Affinitätschromatographie ausser den regulatorischen Untereinheiten der Kinasen keine nachweisbaren Mengen anderer cAMP-bindenden Proteine aus dem Zytosol von Rattenfibroblasten isoliert werden können.

IV. Diskussion

Die Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats in embryonalen Rattenfibroblasten nimmt nach Zugabe von Serum ins Kulturmedium innerhalb weniger Minuten drastisch ab. Da das cyclische Nukleotid - wie experimentell gezeigt wurde - nicht ins Aussenmedium abgegeben wird, müssen sehr rasch die Enzymsysteme, die cAMP metabolisieren, aktiviert (Phosphodiesterase) bzw. gehemmt (Adenylatcyclase) werden. Eine direkte Wirkung des Serums auf diese Systeme konnte in vitro nicht nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit dargelegten Daten sprechen für eine regulative Rolle des Calciums. Unmittelbar nach Zugabe von S 1 und S 2 werden nämlich Strukturen der Plasmamembranen verändert, was zu einer erhöhten Aufnahme von Ca^{2+}- und K^{+}-Ionen in die Zellen führt (40, 41). In Gegenwart der Serumfaktoren beträgt bei einer Ca^{2+}-Konzentration des Kulturmediums von 1×10^{-3} M die intrazelluläre Gesamtkonzentration an austauschbarem Calcium, die mit ^{45}Ca bestimmt wurde, $1{,}1 \times 10^{-3}$M (41). L.B.Nanninga (118) berechnete die freie Ca^{2+}-Konzentration im Muskel zu ungefähr 40 % der gesamten Calcium-Konzentration, d.h. bei embryonalen Rattenfibroblasten

ist sie demnach etwa $4,4 \times 10^{-4}$ M. Bei dieser Calcium-Konzentration, die nach Stimulierung intrazellulär erreicht wird, besitzt in vitro die Phosphodiesterase mit der niederen Michaeliskonstanten ein Aktivitätsmaximum und wird gleichzeitig die Adenylatcyclase zu mehr als 70 % gehemmt.

Die Serumfaktoren sind zwar weitgehend charakterisiert (39, 119-121), doch die spezifischen Wechselwirkungen mit der Zellmembran sind unbekannt. Die Proteine müssen das K^+- und Ca^{2+}-Transportsystem beeinflussen.

Stein et al. (123) fordern für den Na^+- und K^+-Transport in allen tierischen Geweben die gleiche (Na^+- und K^+-)aktivierte ATPase (ATP-Phosphohydrolase, E.C.3.6.1.3.). Dieses Enzym ist wie das für den Glucosetransport durch die Erythrozytenmembran beschriebene (124) ein Tetramer ($\alpha_2\beta_2$) und kommt in zwei Konformationen vor. Das Enzym soll asymmetrisch in der Membran eingebettet sein; dies entspricht der Forderung des flüssigen Mosaic-Modells (125). Die aktiven Zentren der α-Untereinheiten befinden sich in der Membranhälfte, die dem Zellinneren zugewandt ist, die der β-Untereinheiten sind in der äusseren Hälfte der Zellmembran. Einer hohen Affinität für Na^+ entspricht eine niedere K^+-Bindung und umgekehrt. Die zwei Konformationen der ATPase sind funktionell und energetisch gleichwertig. Der stete Übergang von einer Kon-

formation in die andere reicht aus, um den aktiven Transport im Gange zu halten.

Die Beeinflussung des Ca^{2+}-Spiegels durch Serumproteine ist komplexer, da der Ca^{2+}-Transport in die Zellen passiv verläuft, während die Abgabe von Ca^{2+} ins Kulturmedium enzymatisch reguliert wird. Wie Buchley et al. (126) zeigten, haben Membranen mit erhöhtem Polyphosphoinositol-Gehalt eine vermehrte Ca^{2+}-abhängige ATPase-Aktivität als Membranen mit normaler Konzentration. Die (Na^+- und K^+)-ATPase-Aktivität ist dabei jedoch nicht erhöht. Daraus geht hervor, dass erste Evidenz für die Regulation des intrazellulären Calciumgehaltes ein erhöhter Inositolstoffwechsel ist. In einer neueren Arbeit (127) wird ausserdem bei vermehrtem Linolensäureeinbau in das sarkoplasmatische Retikulum der Rattenskelettmuskulatur eine Steigerung der Ca^{2+}-Aufnahme beschrieben.

Weiterer Effektor für die Phosphodiesterase (PDE I) könnte cGMP sein (89, 100, 101). Dieses zyklische Nukleotid aktiviert das Enzym in der extrem niederen Konzentration von 10^{-11} M maximal. Dies steht im Einklang mit neueren Untersuchungen, nach denen bei einigen Zellsystemen dem Abfall der cAMP-Konzentration ein Anstieg des cGMP-Spiegels parallel geht (128). Sollte dies auch für das System der embryonalen Rattenfibroblasten zutreffen, so muss von den

cGMP-metabolisierenden Enzymen dasselbe gefordert werden wie von den cAMP-regulierenden Systemen: Die Enzyme müssen sehr rasch durch einen Effektor beeinflusst werden, der nach Stimulierung durch Serumfaktoren in die Zelle gelangt oder in ihr freigesetzt wird. Vielleicht kommt dem Calcium auch diese Funktion zu.

Adenosintriphosphat ist ein negativer Effektor der Phosphodiesterase. Nach Cheung (129) hemmt ATP (2 mM) die PDE in vitro zu 73 %. Nun fällt nach Stimulierung der Rattenfibroblasten mit Serum der ATP-Gehalt der Zellen ($2{,}5 \times 10^{-3}$ M) schon innerhalb 5 min um 20 % ab (43), erreicht aber nach 30 min wieder den Ausgangswert. Inwieweit die Abnahme der Phosphodiesterasehemmung durch den ATP-Abfall eine physiologische Bedeutung besitzt, ist nicht bekannt.

Die Abnahme der ATP-Konzentration kann auch in bezug auf die Adenylatcyclase eine Rolle spielen. Nach neueren Ergebnissen soll die Adenylatcyclase (130) in einer aktiven phosphorylierten und einer gehemmten dephosphorylierten Form in der Zellmembran vorkommen. Unterstützt werden diese Befunde durch das Vorkommen einer durch cAMP stimulierten Proteinkinase. ATP ist auf jeden Fall der Phosphatdonor für die Phosphorylierungsreaktion. So kann man als weitere Möglichkeit der Adenylatcyclase-Hemmung nach Stimulierung mit Serum (neben der Inaktivierung durch Ca^{2+}-Ionen) die Verrin-

gerung des Substrates und des Effektors (cAMP) der Proteinkinase in Betracht ziehen. Dies ist eine rein hypothetische Annahme, da cAMP in der Zelle wahrscheinlich kompartimentiert ist und der cAMP-Gehalt insgesamt zwar abfallen, jedoch in einzelne Kompartimenten ansteigen kann.

Folgt die Geschwindigkeit des cAMP-Abbaues durch die Phosphodiesterase der Michaelis-Menten-Kinetik, so ist ein cAMP-Spiegel, der für einen Aktivierungsprozess notwendig ist, nicht gewährleistet. Ein positiv kooperativer Mechanismus kommt ebenfalls nicht in Frage, da hierbei die Umsatzgeschwindigkeit zu sehr bei einer nur kleinen cAMP-Änderung ansteigt. Appleman et al. (131) fordern daher, dass die Phosphodiesterase ein allosterisches Enzym mit zwei Bindungsstellen ist, das einer negativen Kooperativität folgt, d.h. die Kooperativitätskonstante des Enzyms muss kleiner als eins sein. Negative Kooperativität lässt sich nur nach dem "induced-fit"-Modell von Koshland beschreiben. Frieden (132) bezeichnet Enzyme, die langsam auf eine Veränderung der Substratkonzentration reagieren, "hysteretische" Enzyme. Wang et al. (133) konnten ebenso wie Appleman et al. (131) die Phosphodiesterase als "hysteretisches Enzym" charakterisieren.

Die kinetischen Daten dieser Arbeit sind jedoch nach Michaelis-Menten berechnet. In allen Fällen wichen die v-s-Diagramme der Phosphodiesterase mit niederem K_{Mapp} vom hyperbolen Kurvenverlauf ab. Dies legt den Schluss nahe, dass die Phosphodiesterase I aus embryonalen Rattenfibroblasten ein allosterisches Enzym ist.

Völlig unklar ist bisher, weshalb mit zunehmendem Alter der Zellen die Phosphodiesterase-Aktivität abnimmt. Mehrere Möglichkeiten sind für dieses physiologische Phänomen denkbar. Erstens könnte die Zahl der Enzymmoleküle pro Zelle vermindert sein, was nur durch Titration mit Antikörpern feststellbar ist. Zur Gewinnung von Antikörpern sind jedoch reine Enzympräparationen erforderlich. Wegen ihres geringen Vorkommens wurde die Phosphodiesterase aus Zellkulturen bisher nicht isoliert. Weiterhin könnte ein Protein (93), das das Enzym aktiviert und im Verhältnis 1 : 1 zu ihm vorhanden sein muss, in älteren Zellen weniger synthetisiert werden. Ein solcher Proteinaktivator, der als katalytischer Effektor der Phosphodiesterase in frühen Passagen vorhanden ist, konnte durch Kombinationsversuche mit älteren Zellen nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Erklärung für die Enzymaktivitätsabnahme wäre ein Anstieg der Konzentration eines Phosphodiesteraseinhibitors (135) bei Fibroblasten höherer Passagen. Ausserdem wäre möglich, dass ein Protein, das den Abbau

der Phosphodiesterase verhindert, in geringem Umfang gebildet wird. Ein derartiges Protein, das den Katabolismus eines Enzyms reguliert, ist von Tomkins et al. (136) für die Tyrosinaminotransferase beschrieben worden.

Literaturverzeichnis

(1) E.W. Sutherland, T.W. Rall: J.Amer.Chem.Soc. 79, 3608 (1957)

(2) I. Pastan, R. Perlman: Science 169, 339 (1970)

(3) G. Zubay, D. Swartz, J. Beckwith: Proc.Nat.Acad. Sci. US 66, 104 (1970)

(4) M. Emmer, B. de Crombrugghe, I. Pastan, R. Perlman: Proc.Nat.Acad.Sci. US 66, 480 (1970)

(5) I. Pastan, R.L. Perlman: J. Biol. Chem. 244, 2226 (1969)

(6) M. Takeda, Y. Ohga: J.Biochem. 73, 621 (1973)

(7) T.A. Langan: Proc.Nat.Acad.Sci. US 64, 1276 (1969)

(8) E.M. Johnson, V.G. Allfrey: Arch.Biochem.Biophys.152, 786 (1972)

(9) D. Greengard, J.F. Kuo, E. Miyamoto: Advances in Enzyme Regulation 9, 113 (1971)

(10) W. Frank: Exptl.Cell Res. 71, 238 (1971)

(11) M.L. Heidrick, W.L. Ryan: Cancer Res. 30, 376 (1970)

(12) M.L. Heidrick, W.L. Ryan: Cancer Res. 31, 1313 (1971)

(13) G.S. Johnson, I. Pastan: J.Nat.Cancer Inst. 47, 1357 (1971

(14) H. Masui, L.D. Garren: Proc.Nat.Acad.Sci. US 68, 3206 (1971)

(15) J.V. Ruch, V. Karcker: C.R.Soc.de Biol. 163, 803 (1969)

(16) W.L. Ryan, L.M. Heidrick: Science 162, 1484(1968)

(17) J.R. Sheppard: Proc.Nat.Acad.Sci.US 68, 1316 (1971)

(18) J.R. Sheppard: Nature New Biol. 236, 14 (1972)

(19) J.F. Whitfield, J.P. MacManus, D.J. Gillan, J.Cell Physiol. 81, 241 (1973)

(20) J.F. Whitfield, J.P. MacManus, T.Yondale, D.J.Franks: J.Cell Physiol. 78, 355 (1971)

(21) J.F. Whitfield, H. Rixon, A.D. Perris: Exptl.Cell Res. 57, 8 (1969)

(22) S.D.Balk: Proc.Nat.Acad.Sci.US 68, 271 (1971)

(23) H. Rasmussen, A. Tenenhouse: Proc.Nat.Acad.Sci. US 59, 1364 (1968)

(24) R.P. Rubin, R.A. Carchman, S.D. Jaanus: Nature New Biol. 240, 150 (1972)

(25) P.V. Hauschka, P.E. Leighton, R.W. Rubin: Proc.Nat. Acad.Sci. US 69, 30542 (1972)

(26) R. Kram, G.M. Tomkins: Proc.Nat.Acad.Sci.US 70, 1659 (1973)

(27) R. Kram, D. Mamont,G.M. Tomkins: Proc.Nat.Acad.Sci. US 70, 1432 (1973)

(28) G.S. Johnson, I. Pastan: Nature New Biol. 236, 247 (1972)

(29) F. Grinell, M. Milam, P.A. Srere: Nature New Biol. 241, 82 (1973)

(30) S.G. Johnson, W.D. Morgan, I. Pastan: Nature 235, 54 (1972)

(31) J.F. Goggius, G.S. Johnson, I. Pastan: J.Biol.Chem. 247, 5759 (1972)

(32) G.S. Johnson, R.M. Friedman, I. Pastan: Proc.Nat. Acad.Sci. US 68, 425 (1971)

(33) E.G. Moore, H.W. Tenia: Nature 231, 117 (1971)

(34) R. Kurth, H. Bauer: Nature New Biol. 243, 243 (1973)

(35) W. Frank, S. Zabel: Exptl.Cell Res. 59, 186 (1970)

(36) R. Dulbecco: Nature 227, 82 (1970)

(37) W. Frank, H.J. Ristow, S. Zabel: Eur.J.Biochem.14, 392 (1970)

(38) D. Hülser, W. Frank: Z.Naturforsch. 26b, 10 (1971)

(39) R. Hoffmann, H.-J. Ristow, J. Veser, W. Frank: Exptl.Cell Res.80, 275 (1973)

(40) H.-J. Ristow, W. Frank, M. Fröhlich: Z.Naturforsch. 28c, 188 (1973)

(41) W. Frank: Z.Naturforsch. 28c, 322-328 (1973)

(42) M. Hümpel, W. Frank: Z.Naturforsch. 27b, 1399 (1972)

(43) J. Grimm, W. Frank: Z.Naturforsch. 27b, 562 (1972)

(44) J. Grimm, unveröffentl. Ergebnis

(45) N.D. Lee: J.Biol.Chem. 219, 211 (1956)

(46) L.D. Garren, R.R. Howell, G.T. Tomkins, R.M. Croco: Proc.Nat.Acad.Sci. US 52, 11121 (1964)

(47) A.M. Nemeth: J.Biol.Chem. 237, 3703 (1962)

(48) H.L. Segal, Y.S. Kim: Proc.Nat.Acad.Sci. US 50,912 (1963)

(49) W. Frank, H.-J. Ristow, S. Schwalb: Exptl.Cell Res. 70, 390 (1972)

(50) J.S. Polinger: Exptl. Cell Res. 63, 78 (1970)

(51) R. Dulbecco, G. Freeman: Virology 8, 396 (1959)

(52) J.P. Marcus, S.J. Cieciura, T.T. Puck: J.Exptl. Med. 104, 615 (1956)

(53) Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1967, S. 630

(54) A.L. Steiner, M.W. Parker, D.M. Kipnis: J.Biol. Chem. 247, 1106 (1972)

(55) A.L. Steiner, D.M. Kipnis, R. Utiger, C. Parker: Biochemistry 64, 367 (1969)

(56) J.G. Hemington, M. Chenowetu, A. Dunn: Biochim. Biophys. Acta 304, 552 (1973)

(57) Methods in Immunology and Immunochemistry, ed. C.A. Williams and M.W. Chase (New York: Academic Press, 1967), S. 319

(58) R.S. Makman, E.R. Sutherland: J.Biol.Chem. 240, 1309 (1965)

(59) M. D'Armiento, G.S. Johnson, I. Pastan: Nature New Biol. 242, 78 (1973)

(60) E.W. Sutherland, T.W. Rall: J.Biol.Chem. 232, 1077 (1958)

(61) R. Keck: Arch.Biochem.Biophys. 63, 446 (1956)

(62) J. Grimm: Diplomarbeit, Tübingen (1971)

(63) Informationsheft: Cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (Boehringer Mannheim)

(64) H.-J. Ristow, pers. Mitt.

(65) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

(66) M.E. Pullman, H.S. Penefsky, A. Datta, E. Racker: J.Biol.Chem. 235, 3322 (1960)

(67) J.B. Courtright, U. Henning: J.Bacteriol. 102, 722 (1970)

(68) H.U. Bergmeyer, E. Bernt: Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, 1972, S. 535

(69) E. Schmidt: Methoden der Enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer,Verlag Chemie, 1962, S. 607

(70) G.W. Löhr, H.D. Waller: Methoden der Enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, 1962, S.599

(71) G.N. Wilkinson: Biochem.J. 80, 324 (1961)

(72) P. Cuatrecasas: J.Biol.Chem. 245, 3059 (1970)

(73) I. Tesser, H.-U. Fisch, R. Schwyzer: FEBS Letters 23, 56 (1972)

(74) J.B. Murphy, M.W. Kies: Biochim. Biophys.Acta 45, 384 (1960)

(75) M. Tao, M.L. Salas, F. Lipmann: Proc.Nat.Acad.Sci. US 67, 408 (1970)

(76) I. Oye, E.W. Sutherland: Biochim.Biophys.Acta 127, 347 (1966)

(77) J.H. Exton, C.R. Park: J.Biol.Chem. 243, 4184 (1968)

(78) F. Murad, M. Vaugham: Biochem.Pharmac. 18, 1053 (1969)

(79) W. J. Thompson, M.M. Appleman: Biochemistry 10, 311 (1971)

(80) K.G. Nair: Biochemistry 5, 150 (1966)

(81) S.J. Ashroft, P.J. Randle, J.B. Täljedal: FEBS Letters 20, 263 (1972)

(82) P.R. Sharma: Cancer Res. 32, 1734 (1972)

(83) M. D'Armiento, G.S. Johnson, I. Pastan: Proc.Nat. Acad. Sci. US 69, 454 (1972)

(84) S.-Y. Song, W.Y. Cheung: Biochim.Biophys.Acata 242, 593 (1971)

(85) T.R. Russel, W.L. Terasaki, M.M. Appleman: J.Biol. Chem. 248, 1334 (1973)

(86) R.A. Levine: Biochim.Biophys.Acta 149, 1 (1967)

(87) M.T. Campell, J.G. Oliver: Eur.J.Biochem. 28, 30 (1972)

(88) E.G. Loten, J.G.T. Sneyel: Biochem.J. 120, 87 (1970)

(89) O.M. Rosen: Arch.Biochem.Biophys. 137, 435 (1970)

(90) S. Jard, M. Bernard: Biochem.Biophys. Res.Commun. 41, 781 (1970)

(91) S. Kakiuchi, A. Amazaki, Y. Teshima: Biochem.Biophys.Res.Commun. 42, 968 (1971)

(92) W.Y. Cheung: Biochim.Biophys.Acta 191, 303 (1965)

(93) W.Y. Cheung: J.Biol.Chem. 246, 2859 (1971)

(94) Y.C. Huang, R.G. Kemp: Biochemistry 10, 2278 (1971)

(95) J. Schulz, J.W. Daly: J.Biol.Chem. 245, 853 (1973)

(96) W.Y. Cheung: Biochim.Biophys.Acta, 242, 395 (1971)

(97) S. Kakiuchi, R. Yamazuki: Biochem.Biophys.Res. Commun. 41, 1104-1110 (1970)

(98) G. Brooker, L.J. Thomas, M.M. Appleman: Biochemistry 7, 4177 (1968)

(99) R.F. O'Dea, M.K. Haddox, N.D. Goldberg: Fed.Proc. 29, 493 (1970)

(100) J.A. Beavo, J.G. Hardman, E.W. Sutherland: J.Biol. Chem. 245, 5649 (1970)

(101) J.A. Beavo, J.G. Hardman, E.W. Sutherland: J.Biol. Chem. 246, 3841 (1971)

(102) E. Kaukel, K. Mundhenk, H. Hilz: Eur.J.Biochem. 27, 197 (1972)

(103) J.N.M. Heersche, S.A. Fedak, G.D. Aurbach: J.Biol. Chem. 246, 6770 (1971)

(104) W. Frank, S. Zabel: Exp.Cell Res. 59, 186 (1970)

(105) J.F. Clark, H.P. Morris, G. Weber: Cancer Res. 33, 356 (1973)

(106) G. Rosselin, P. Freychet: Biochim. Biophys.Acta 304, 541 (1973)

(107) H. Friedrich-Freksa, A. Simon, H. Pachowsky: Z.Naturforsch. 28c, 195 (1973)

(108) L.R. Forte: Biochim.Biophys.Acta 266, 524 (1970)

(109) P.D.R. House, P. Poulis, M.J. Weidemann: Eur.J. Biochem. 24, 429 (1972)

(110) S. Matsuzaki, J.E. Dumont: Biochim.Biophys.Acta 284, 227 (1972)

(111) K. v. Hungen, S. Roberts: Eur.J.Biochem. 36, 391 (1973)

(112) H.U. Bergmeyer: Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, 1962, S. 972

(113) W.B. Anderson, G.S. Johnson, I. Pastan: Proc.Nat. Acad. Sci. US 70, 1055 (1973)

(114) E.A. Kuchl, J.L. Hunnes, J. Tarnoff, V.J.Cirillo, E.A. Ham: Science 169, 883 (1970)

(115) S. Nabuzaki, J.E. Dumont: Biochim.Biophys.Acta 284, 227 (1972)

(116) K.D. Hepp: Eur.J.Biochem. 31, 266 (1972)

(117) W.B. Anderson, E. Lovelace, I. Pastan: Biochem. Biophys.Res.Commun. 52, 1293 (1973)

(118) M. Wilchek, Y. Salomon, M. Lowe, Z. Selinger: Biochem.Biophys.Res.Commun. 45, 1177 (1971)

(119) L.B. Nanninga: Biochim.Biophys.Acta 54, 338 (1961)

(120) J.Veser, W. Frank: Z.Naturforsch. 27b, 1573 (1972)

(121) R. Renner, K.D. Hepp, J. Veser, W. Frank: Exptl. Cell Res., im Druck

(122) H.-J. Ristow, J. Veser, W. Frank: in Vorbereitung

(123) V.T. Marchesi, G.E. Palade: J.Cell Biol. 35, 385 (1967)

(124) W.D. Stein, W.R. Lieb, S.J.D. Karlish, Y. Eilam: Proc.Nat.Acad.Sci US 70, 275 (1973)

(125) W.R. Lieb, W.D. Stein: Nature New.Biol. 230, 108 (1971)

(126) S.J. Singer, G.L. Nicolson: Science 175, 720 (1972)

(127) J.T. Buchley, J.N. Hawthorne: J.Biol.Chem. 247, 7218 (1972)

(128) R.K. Tume, R.P. Newbold, D.J.Horgan: Arch. Biochem.Biophys. 157, 485 (1973)

(129) J.W. Hadden: Proc.Nat.Acad.Sci.US 69, 3024 (1972)

(130) W.Y.Cheung: Biochem.Biophys.Res.Commun. 23, 214 (1966)

(131) A.Constantopoulos, V. Najjar: Biochem.Biophys. Res.Commun. 53, 794 (1973)

(132) T.R.Russell, W.J. Thompson, F.W. Schneider, M.M. Appleman: Proc.Nat.Acad.Sci.US 69, 1791 (1972)

(133) C. Frieden: J.Biol.Chem. 245, 5788 (1970)

(134) J.H.-C. Wang, T.S. Teo, T.H. Wang: Biochem.Biophys. Res.Commun. 46, 1306 (1972)

(135) V. Riedel, D. Malchow, G. Gerisch, B. Nägele: Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 279 (1972)

(136) G.M. Tomkins, T.D. Gelehrter, D. Granner, D. Martin,Jr., H.H. Samuels, E.B.Thompson: Science, 166, 1474 (1971)

Abkürzungen

3'5'-cyclisches Adenosinmonophosphat	cAMP
3'5'-cyclisches Guanosinmonophosphat	cGMP
N^6-O^2-dibutyryl.3'5'-cyclisches Adenosinmonophosphat	bu_2cAMP
Prostaglandin E_1	PGE_1
Adenosintriphosphat	ATP
Adrenocorticotropes Hormon	ACTH
Äthylendiamintetraessigsäure	EDTA
Äthylenglykol-bis(ß-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure	EGTA
Phosphodiesterase	PDE
Adenylatcyclase	AC
Lactatdehydrogenase	LDH
Succinatdehydrogenase	SDH
Glutamatdehydrogenase	Glut-DH
Adenosintriphosphatphosphohydrolase	ATPase
Kälberserum	KS
Eagle-Medium	Ea
Trichloressigsäure	TCA
Perchloressigsäure	PCA
0,15 N NaCl, 0,01 M NaH_2PO_4	PBS
Phosphoenolpyruvat	PEP
3-(4,5-Dimethyltheozolyl-2)2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid	MTT
N-methylphenaziniummethosulfat	PMS
Zellen	Z.

Lebenslauf

Johanna Grimm	
11. August 1946	geboren in Dillingen/Donau
	Vater: Johann Georg Grimm
	Mutter: Johanna Grimm geb. Heigel

Ausbildung:

1952 - 1957	Volksschule in Dillingen
1957 - 1966	St.Bonaventura-Gymnasium in Dillingen
1966 - 1971	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Dez. 1971 - Okt. 1973	Experimenteller Teil der Dissertation am Max-Planck-Institut für Virusforschung unter Anleitung von Prof. W. Frank

Examina:

1967	Vordiplom, Teil I
1969	Vordiplom, Teil II
1971	Diplom

Akademische Lehrer:

Dr. E. Bayer	Dr. H. Krüger
Dr. E. Bünning	Dr. H. Mauser
Dr. W. Frank	Dr. F.P. Möhres
Dr. H. Friedrich-Freksa	Dr. E. Müller
Dr. A. Gierer	Dr.H. Remmer
Dr. M. Hanack	Dr. W. Rüdorff
Dr. G. Jung	Dr. F. Schneider
	Dr. G. Weitzel